
INDICE

I. INTRODUZIONE	PAG.1
II. LA CLOZAPINA	PAG. 6
STORIA E SCOPERTA	PAG. 7
CARATTERISTICHE CHIMICHE	PAG. 8
ATTIVITÀ FARMACOLOGICA	PAG. 9
▪ Farmacodinamica	
▪ Farmacocinetica	
SPETTRO DI EFFICACIA	PAG. 14
▪ Spettro schizofrenico	
▪ Disturbi dell'umore	
▪ Disturbi di personalità	
▪ Disturbi in età evolutiva	
▪ Disturbi neurologici	
EFFETTI COLLATERALI E TOLLERABILITÀ	PAG. 21
DOSAGGIO E MONITORAGGIO CLINICO E PLASMATICO DELLA CLOZAPINA	PAG. 35
III. LA VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA ALLA CLOZAPINA	PAG. 40
LA VARIABILITÀ NEL SISTEMA EPATICO DEL CITOCROMO P450	PAG. 41
FATTORI FISIOLÓGICI E PATOLOGICI	PAG. 44
FATTORI AMBIENTALI	PAG. 45
▪ Le interazioni farmacologiche	

FATTORI GENETICI	PAG. 57
▪ La farmacogenetica e la farmacogenomica	
▪ I polimorfismi del citocromo P450 1A2	
▪ Fenotipizzazione e genotipizzazione del citocromo P450 1A2	
▪ Differenze etniche nella risposta alla clozapina	
IV. STUDIO SPERIMENTALE	PAG. 66
PREMESSE E SCOPO DEL LAVORO	PAG. 67
MATERIALI E METODI	PAG. 70
▪ Disegno dello studio	
▪ Descrizione del campione	
▪ Reperimento dei campioni biologici ed estrazione del DNA	
▪ Identificazione dei polimorfismi nel gene CYP1A2 mediante Real-Time PCR	
▪ Espressione del CYP1A2 mRNA	
▪ Analisi statistica	
▪ Criteri per la conservazione dei dati sensibili e del materiale biologico	
RISULTATI	PAG. 79
▪ Analisi delle caratteristiche del campione	
▪ Identificazione dei polimorfismi *F e *C e loro espressività	
▪ Livelli di espressione del mRNA per il gene CYP1A2	
DISCUSSIONE	PAG. 84
V. CONCLUSIONI	PAG. 90
VI. APPENDICE	PAG. 94
VII. BIBLIOGRAFIA	PAG. 97

I. INTRODUZIONE

L'uso dei farmaci antipsicotici, di nuova e vecchia generazione, è caratterizzato da una notevole variabilità nell'efficacia terapeutica e nell'insorgenza di effetti collaterali. Questo può rendere la loro gestione in ambito clinico complessa e delicata e spesso non favorisce la compliance terapeutica.

I meccanismi alla base della variabilità interindividuale nella risposta agli antipsicotici e nella comparsa di eventi avversi sono in gran parte sconosciuti, ma si ipotizza che fattori di ordine genetico possano svolgere un ruolo significativo in proposito (Wilffert et al., 2005). Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è sempre più focalizzata sugli aspetti farmacogenetici in grado di influenzare la risposta agli antipsicotici sia dal punto di vista farmacodinamico che farmacocinetico.

Sul versante farmacodinamico sono in corso ricerche con interessanti prospettive riguardanti i polimorfismi recettoriali. Tuttavia i risultati ottenuti non lasciano intravedere la possibilità, almeno nel breve periodo, di utilizzare la genotipizzazione recettoriale come strumento nella previsione della risposta alla terapia farmacologica con farmaci antipsicotici.

Gli studi di farmacocinetica, invece, si focalizzano soprattutto sulla valutazione del metabolismo di fase I e, in particolare, sul ruolo svolto in tale contesto dal sistema enzimatico del citocromo P450 con i suoi numerosi polimorfismi (T.E.C., 2004; de Leon, 2006; Arranz e de Leon, 2007). Infatti per alcuni isoenzimi del sistema CYP450 è stato possibile individuare polimorfismi genetici che si correlano con una modificazione dell'attività metabolica rispetto alla norma. Soggetti "scarsamente metabolizzanti" per un determinato isoenzima potrebbero più facilmente andare incontro a reazioni avverse ed

effetti collaterali durante la somministrazione di farmaci che per la loro eliminazione dipendono da tale isoenzima, anche a dosaggi considerati normalmente terapeutici; viceversa soggetti “altamente metabolizzanti” potrebbero presentare una risposta insoddisfacente al farmaco con riduzione della sua efficacia.

In ambito psichiatrico gli studi farmacogenetici hanno trovato interessanti applicazioni. Una delle più rilevanti riguarda lo studio dei fattori genetici che influenzano il metabolismo della clozapina.

Tra tutti gli antipsicotici attualmente disponibili, la clozapina riveste un ruolo di primo piano per l’indiscussa utilità terapeutica, che tuttavia si accompagna a una scarsa maneggevolezza in ambito clinico. La clozapina è stato il primo antipsicotico a essere approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) con l’indicazione per la “terapia della schizofrenia resistente al trattamento” (Citrome et al., 2002). Si tratta infatti di un efficace antipsicotico atipico con una percentuale di risposta del 60% nei pazienti non responders ai neurolettici classici (Wagstaff, 2003; Eap et al., 2004) e a cui si associa la quasi totale assenza di effetti extrapiramidali. Nonostante questi indubbi vantaggi, durante il trattamento con clozapina, possono insorgere effetti collaterali di significativa gravità che determinano considerevoli problemi nella gestione della terapia (Croissant et al., 2005) e che, in alcune occasioni, possono rendere necessaria la riduzione del dosaggio per migliorare l’impatto degli eventi avversi (Yamin & Vaddadi, 2010) o addirittura la sospensione del trattamento, con possibili conseguenze negative sul piano psicopatologico. Questo comporta un sottoutilizzo di clozapina (Joover & Boksa, 2010), nonostante sia riconosciuto

come unico antipsicotico di seconda generazione superiore in efficacia rispetto ai neurolettici negli studi indipendenti di “effectiveness” (Foussias & Remington, 2010).

I meccanismi patogenetici implicati nella comparsa di tali eventi avversi non sono ancora completamente noti, ma alcuni potrebbero essere correlati alla concentrazione plasmatica del farmaco (infatti risultano più frequenti per livelli plasmatici di clozapina al di sopra di 1000 ng/ml) e quindi dipendere dal suo metabolismo intra ed extraepatico.

Infatti si può affermare che, se più soggetti rispondono in modo diverso allo stesso farmaco somministrato alla medesima dose, ciò è in parte legato alle differenze farmacocinetiche secondarie al maggiore o minore funzionamento degli enzimi metabolizzanti epatici.

La clozapina è metabolizzata per il 70% nel fegato dal citocromo CYP450 1A2 (Bertilsson et al., 1994; Özdemir et al., 2001). In letteratura sono presenti numerosi studi in cui viene riportato come esistano consistenti differenze interindividuali nell'attività del CYP1A2 (Fuhr et al., 1994). Per il gene del CYP1A2 sono stati infatti identificati diversi polimorfismi che si correlano con variazioni funzionali dell'attività enzimatica. Alcuni ricercatori hanno indagato la possibile relazione fra tali polimorfismi e la risposta clinica alla clozapina, sia in termini di efficacia del trattamento, che di frequenza di comparsa ed entità degli effetti collaterali (Murray et al., 2006).

La tesi si compone di una prima sezione dedicata alla clozapina, con riferimenti riguardanti la storia della scoperta, le caratteristiche chimiche e l'attività farmacologica. Verranno descritte le applicazioni cliniche e le attuali conoscenze relative agli effetti collaterali, alla tollerabilità e al monitoraggio clinico del farmaco.

Nella seconda parte dell'elaborato verrà trattato più in dettaglio il problema della variabilità interindividuale nella risposta alla clozapina con particolare riferimento al ruolo svolto in quest'ambito dai fattori di ordine genetico e dai polimorfismi del sistema enzimatico del citocromo P450.

Infine, verrà esposto il nostro progetto di ricerca che si è proposto di approfondire la relazione tra reazioni avverse (RA) indotte da clozapina e i polimorfismi del CYP450 1A2 che si sono rivelati in grado di influenzare il metabolismo di questo antipsicotico. Seguirà l'esposizione dei risultati ottenuti, la discussione e le conclusioni.

II. LA CLOZAPINA

STORIA E SCOPERTA

La clozapina è stata sintetizzata per la prima volta nel 1958. Come risulta da una revisione di Hippus (1989), i medici austriaci e tedeschi segnalavano per primi, verso la metà degli anni Sessanta, l'efficacia della clozapina come farmaco antipsicotico. Fu immessa sul mercato europeo nel 1972. Sfortunatamente, nel 1974, in Finlandia, otto pazienti trattati con clozapina morirono per il sopravvenire di una condizione di leucopenia con agranulocitosi (Amsler et al., 1977). Pertanto il suo impiego routinario venne sospeso in numerosi Paesi. Tuttavia, poiché molti pazienti schizofrenici a cui era stata sospesa la somministrazione del farmaco andarono incontro a gravi ricadute e non risposero altrettanto positivamente al ripristino dei neurolettici tipici, l'uso della clozapina fu concesso con restrizioni in vari Paesi europei occidentali.

Alla fine degli anni '80, in alcuni centri clinici di ricerca, soprattutto negli Stati Uniti, la clozapina era sempre più utilizzata con alte percentuali di successo in casi di schizofrenia resistenti al trattamento con altri agenti farmacologici. Inoltre, nei casi trattati, il farmaco dimostrava una incidenza di disturbi extrapiramidali nettamente inferiore a quella rilevata nella terapia con gli altri neurolettici in commercio anche per periodi di somministrazione piuttosto lunghi (Casey, 1989; Schmauss et al., 1989).

D'altra parte si era osservato che, monitorando attentamente la crasi ematica, i casi di agranulocitosi (circa 1%) potevano essere identificati precocemente

evitando gli esiti mortali con la tempestiva sospensione del farmaco (Alvir et al., 1993).

Pertanto, sulla base di una rilevante e sempre crescente documentazione clinica, la Food and Drug Administration (FDA) autorizzava l'immissione in commercio della clozapina nel 1993 con l'indicazione limitativa della "terapia della schizofrenia resistente al trattamento" e subordinando il suo uso al monitoraggio continuo della crasi ematica.

In rapida successione quasi tutte le nazioni europee ed extraeuropee autorizzavano la commercializzazione di clozapina con le medesime indicazioni e limitazioni.

In Italia la clozapina (*Leponex*) è stata autorizzata al commercio nel 1995. La formulazione farmaceutica disponibile è la compressa da 25 mg o da 100 mg.

CARATTERISTICHE CHIMICHE

Come riportato dettagliatamente da Baldessarini e Frankenburg nel 1991 la clozapina è una dibenzodiazepina (8-cloro-11-(4-metil-piperazinil)-5H-dibenzo[1,4]diazepina) (Figura 1). È chimicamente correlata agli antagonisti del recettore della dopamina loxapina e clotiapina e agli antagonisti della serotonina-dopamina olanzapina e quetiapina.

Dal momento che rappresenta il primo agente al quale è stato possibile attribuire, accanto a una incisiva proprietà antipsicotica, effetti collaterali extrapiramidali assai modesti o nulli (Fitton e Heel, 1990) e l'assenza di

induzione di discinesia tardiva o di un'elevazione dei livelli di prolattina (Meltzer, 1995), la clozapina viene considerata il prototipo degli antipsicotici atipici (Stahl, 2002).

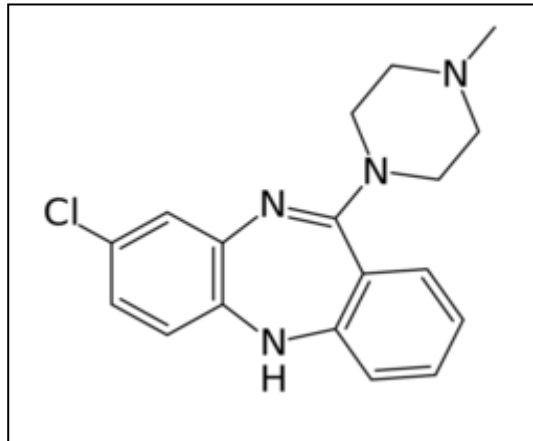


Figura 1. *Struttura molecolare della clozapina*

ATTIVITÀ FARMACOLOGICA

▪ Farmacodinamica

Gli antipsicotici atipici non sono semplicemente degli antagonisti serotonino-dopaminergici (SDA). In realtà essi possiedono alcuni degli insiemi più complessi di proprietà farmacologiche della psicofarmacologia (Stahl, 2002).

La clozapina viene classificata come antagonista recettoriale multiplo per la sua affinità a un'ampia gamma di recettori. Il suo antagonismo si manifesta infatti a livello dei recettori della serotonina 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₆, 5HT₇, della dopamina D₁, D₂, D₄, D₅ e della noradrenalina α_1 e α_2 . Possiede inoltre una

buona capacità di legame con i recettori istaminici H₁ e H₂ e colinergici M₁ e M₄ (Vampini e Bellantuono, 2002).

La sua potenza di blocco recettoriale alle dosi terapeutiche è relativamente più elevata per i recettori 5HT₂ (occupati quasi al 100%) che per i recettori D₂ (occupati al 50%), come ricavato dagli studi in vivo con la tomografia a emissione di positroni (PET).

Nei modelli animali la clozapina appare più attiva sul sistema dopaminergico mesolimbico che su quello nigrostriatale, un'osservazione che si correla con l'assenza di effetti parkinsoniani. La scarsità di Extra Pyramidal Symptoms (EPS) è da imputare inoltre alla bassa affinità del farmaco, rispetto agli antipsicotici tipici, per i recettori dopaminergici D₂, contrariamente a quanto avviene per quelli D₁, per i quali la capacità di legame è riportata intorno a 33-59% (Tabella 1).

In modelli murini è stato inoltre dimostrato che in presenza di un sistema serotoninergico presinaptico integro, clozapina è in grado di normalizzare i recettori NMDA ipofunzionanti, caratteristici della patologia schizofrenica (Yadav et al., 2010).

Rispetto agli altri farmaci della stessa classe si rilevano le seguenti caratteristiche (Pancheri, 2003):

- assieme alla quetiapina è il farmaco con la minima affinità per i recettori D₂;
- tra i farmaci bloccanti 5HT>DA ha la minima affinità per i recettori 5HT_{1A};
- l'affinità per i recettori α₂ si situa subito dopo quella del risperidone;

- l'affinità per i recettori H_1 è inferiore a quella del risperidone e simile a quella della quetiapina;
- l'affinità per i recettori muscarinici è la più elevata di tutto il gruppo.

Sulla base di questi dati di affinità recettoriale la clozapina fa prevedere, a livello clinico prescindendo dalla sua azione antipsicotica, una buona capacità di sedazione con tendenza tuttavia all'aumento di peso (recettori H_1), una bassa incidenza di EPS (ridotta saturazione dei recettori D_2 ed elevato blocco M_1) e una moderata potenzialità di effetti antidepressivi (recettori $5HT_{1A}$).

D₁ dopaminergici	Correlati clinici poco conosciuti. Potrebbe facilitare la trasmissione DA corticofrontale (attività sui sintomi negativi?)
D₂ dopaminergici	Azione sui sintomi positivi. Induzione di EPS e della sindrome negativa da neurolettici (SNN). Rallentamento motorio.
D₄ dopaminergici	Nessuna azione sui sintomi positivi. Possibile, ma non dimostrata azione sul tono dell'umore.
5HT_{2A} serotoninergici	In associazione con il blocco D ₂ (se di entità inferiore a quella del blocco 5HT _{2A}), possibile azione sui sintomi negativi. Azione antiaggressiva. Probabile compensazione dei disturbi EP indotti dal blocco D ₂ .
H₁ istaminici	Sedazione, sonnolenza, azione antiaggressiva. Aumento di peso, ipotensione posturale.
M₁ colinergici muscarinici	Compensazione dei EPS indotti dal blocco D ₂ . Disturbi anticolinergici: xerostomia, ritenzione urinaria, stipsi, tachicardia.
α₁ adrenergici	Sedazione, ipotensione posturale, tachicardia.
α₂ adrenergici	Possibile azione antidepressiva (il blocco degli autorecettori presinaptici normalizzerebbe la trasmissione serotoninergica). Possibile potenziamento dell'attività DA in sede corticofrontale.

Tabella 1. *Correlati clinici del blocco recettoriale della clozapina (estratto da Pancheri, 2003).*

▪ Farmacocinetica

La clozapina viene rapidamente assorbita a livello del tratto gastrointestinale, indipendentemente dall'assunzione di cibo. Il picco plasmatico dopo singola somministrazione orale è raggiunto, in media, dopo 2,5 ore.

La biodisponibilità è molto variabile, in considerazione dell'elevato effetto di "primo passaggio" a livello epatico: viene stimata comunque attorno al 50% circa della dose somministrata.

La clozapina è legata alle proteine plasmatiche nella misura del 97% circa. L'emivita plasmatica dopo somministrazione di 75 mg è di 8 ore. Lo steady-state viene di solito raggiunto in 3-4 giorni.

Il farmaco è estesamente metabolizzato a livello epatico e meno dell'1% viene eliminato per via renale senza subire alcuna trasformazione (Cheng et al., 1988). Il metabolismo si realizza principalmente in seguito a processi di ossidazione catalizzati dall'enzima citocromo P450 1A2 (CYP1A2), con produzione di metaboliti N-desmetil e N-ossido a ridotta attività farmacologica (Baldessarini e Frankenburg, 1991; Eiermann et al., 1997; Prior et al., 1999; Özdemir et al., 2001; Raggi et al., 2004; Murray, 2006). L'eliminazione di tali metaboliti si realizza poi attraverso l'emuntorio renale (50%) e per via intestinale (30%) (Jann et al., 1993; Byerly e De Vane, 1996).

Numerosi studi riportano come altre isoforme del CYP450 siano coinvolte in minor misura nei processi di biotrasformazione della clozapina, e in particolare: il CYP2D6, il CYP3A4, il CYP2C19 e il CYP2C9 (Bertilsson et al., 1994; Eierman et al., 1997; Aitchison et al., 2000; Olesen et al., 2001).

SPETTRO DI EFFICACIA

▪ Spettro schizofrenico

La clozapina è stata autorizzata al commercio sia negli Stati Uniti che in Italia con l'indicazione specifica per la schizofrenia che ha dimostrato una resistenza al trattamento. Sono stati proposti rigorosi criteri per definire la "resistenza al trattamento" della patologia schizofrenica.

I criteri di Kane (1992) richiedono almeno tre periodi distinti di trattamento con almeno due diverse classi di antipsicotici utilizzati per almeno sei settimane a dosaggi equivalenti a 1000 mg di clorpromazina e una stabilizzazione della sintomatologia, senza remissioni, nei cinque mesi precedenti. Tuttavia tali criteri sono apparsi piuttosto rigidi e difficilmente applicabili nella pratica clinica. Per questo Brenner et al. (1990) hanno formulato una scala di valutazione della risposta e della resistenza al trattamento della schizofrenia che prevede sette livelli graduati di farmacoresistenza: remissione clinica, remissione parziale, lieve resistenza, moderata resistenza, grave resistenza, refrattario, gravemente refrattario. I vari livelli vengono definiti sulla base dell'osservazione clinica (velocità di riduzione dei sintomi schizofrenici, persistenza di sintomi negativi o positivi) e con l'attribuzione di un punteggio alle scale *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) di Overall e Gorham (1962), *Clinical Global Impression severity* (CGIs) e *Independent Living Skills Survey* per la valutazione del danno psicosociale.

L'efficacia della clozapina è stata dimostrata non solo nella farmacoresistenza, ma anche nel trattamento dei primi episodi. Inoltre clozapina ha uno specifico

effetto antiaggressività nei pazienti schizofrenici (Topiwala & Seena, 2011) ed è indicata nella polidipsia psicogena e jatrogena (Goldman, 2010).

Mentre l'efficacia sui sintomi positivi e sul quadro clinico globale della malattia è incontestata, vi è discussione in merito alla sua efficacia sui sintomi negativi primari (apatia, abulia, mancanza di progettualità, impoverimento, asocialità). L'evidente miglioramento clinico a questo livello è stato infatti attribuito almeno in parte alla riduzione dei sintomi negativi secondari indotti da trattamenti precedenti. Alcuni studi hanno in realtà dimostrato come l'azione della clozapina sui sintomi negativi si osservi anche nel caso dei primi episodi di schizofrenia mai trattati in precedenza.

Inoltre si è rilevato che il miglioramento sia globale che sui sintomi negativi continua a manifestarsi per periodi molto lunghi di trattamento (fino a 36 mesi e oltre). Ciò rende possibile una reale azione di clozapina sui sintomi negativi primari e non solo sui secondari (Buchanan et al., 1998).

È stata anche sottolineata l'efficacia della clozapina sul sintomo di disorganizzazione (Wahlbeck et al., 1999) e nel trattamento a lungo termine della schizofrenia soprattutto in confronto a farmaci di controllo come aloperidolo e cloropromazina (Rosenheck et al., 1998; Howanitz et al., 1999).

Nella terapia con clozapina si è rilevata una minore incidenza di riacutizzazioni e un minore numero di ricoveri (Meltzer et al., 2010). Il miglioramento nei parametri della qualità della vita con recupero del funzionamento scolastico, lavorativo, familiare e sociale sono dovuti all'implementazione delle competenze cognitive favorita da clozapina (Kaneda et al., 2010).

Infine clozapina previene il rischio di comportamento suicidiario nei pazienti schizofrenici, verosimilmente grazie al miglioramento dei sintomi affettivi (Saunders & Hawton, 2009).

▪ **Disturbi dell'umore**

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia della clozapina nella mania, nel disturbo bipolare a cicli rapidi e nella terapia del disturbo schizoaffettivo (Barbini et al., 1997; Frye et al., 1998; Ciapparelli et al., 2000; Green et al., 2000).

Nel trattamento della mania, la clozapina ha riportato una percentuale di miglioramento pari al 70% dei casi trattati. Gran parte della documentazione clinica oggi disponibile fa riferimento a una casistica di mania con sintomi psicotici (deliri, allucinazioni, disorganizzazione). In questi casi l'efficacia della clozapina è risultata evidente sia nelle osservazioni a breve che a lungo termine. I dosaggi utilizzati sono analoghi a quelli della terapia della schizofrenia. Nel caso della mania acuta le dosi iniziali tendono a essere superiori (400-500 mg/die), con una successiva riduzione progressiva, parallelamente al miglioramento sintomatologico. Resta aperto il problema dell'utilizzazione della clozapina come terapia di mantenimento sia pure a dosi ridotte.

Il disturbo bipolare a cicli rapidi può risultare particolarmente resistente al trattamento con gli stabilizzatori. In particolare la risposta alla litioterapia appare molto scarsa. La risposta agli anticonvulsivanti è migliore, ma la

percentuale di insuccessi terapeutici permane comunque piuttosto elevata. Per questa ragione nel trattamento di tale disturbo vengono spesso associati antipsicotici tipici, con l'aumento tuttavia del rischio di disturbi extrapiramidali e in particolare di discinesia tardiva. A partire dal 1991 sono stati riferiti in letteratura numerosi casi di netta efficacia della clozapina, in termini di riduzione di frequenza e di gravità degli episodi, nel disturbo a cicli rapidi resistente a ogni altra forma di trattamento. I risultati positivi si riferiscono sia alla monoterapia che alla terapia in add-on.

Infine, l'evidenza clinica dell'efficacia della clozapina nel disturbo schizoaffettivo sembra positiva (la percentuale di casi resistenti ad altri trattamenti in cui è stato riscontrato un miglioramento significativo oscilla tra il 60 e il 70% del totale), ma necessita di ulteriori conferme (Pancheri, 2003).

▪ **Disturbi di personalità**

I dati disponibili si riferiscono quasi esclusivamente all'utilizzo della clozapina nel trattamento del disturbo borderline di personalità. In questi pazienti il trattamento con clozapina a dosi relativamente basse (25-100 mg/die) ha dimostrato di permettere un buon controllo sia sulla dimensione psicotica che sulla dimensione affettiva. Sul piano comportamentale l'uso di clozapina in monoterapia ha consentito una netta riduzione dell'impulsività e dei comportamenti aggressivi (Benedetti et al., 1998).

▪ Disturbi in età evolutiva

La clozapina ha una buona documentazione del suo impiego in età evolutiva. In uno studio controllato vs aloperidolo condotto da Kumra et al. (1996), la clozapina ha dimostrato una rilevante efficacia nel trattamento della schizofrenia a inizio precoce resistente agli altri interventi terapeutici. Comunque questi importanti risultati vanno osservati alla luce dei fenomeni indesiderati indotti dal trattamento. In particolare la neutropenia si è verificata nel 2,4% dei casi, in misura dunque superiore a quanto osservato nell'adulto. Inoltre nel 30% dei pazienti trattati si è rilevato un abbassamento della soglia convulsivante con anomalie EEG, normalizzate con l'aggiunta di valproato di sodio.

I possibili rischi del trattamento con clozapina possono d'altra parte essere minimizzati dall'attento monitoraggio del paziente, sia dal punto di vista somatico che psicopatologico. Recentemente infatti clozapina è stata indicata per il trattamento della schizofrenia ad esordio precoce nei bambini e negli adolescenti, nei quali si è dimostrata addirittura più efficace che negli adulti (Mattai et al., 2010).

▪ Disturbi neurologici

La clozapina è stata usata con buoni successi terapeutici nel trattamento della discinesia tardiva (Pancheri, 2003; Bhidayasiri & Boonyawairoj, 2010). Il miglioramento si verifica in un'alta percentuale di casi entro 2-4 settimane dall'inizio del trattamento ed è dose-dipendente. Nel 20-30% dei casi trattati è

stata descritta una remissione completa della sintomatologia per dosaggi analoghi a quelli usati nella terapia della schizofrenia. Questa specifica attività terapeutica è stata attribuita all'affinità molto simile della clozapina per i recettori D₁ e D₂, al potente antagonismo 5HT₂ e alla sua azione anticolinergica. Tali fattori con azione sommatória potenzierebbero l'attività dopaminergica del fascio nigrostriatale.

Come riportato in letteratura, clozapina può essere utilizzata con successo per il trattamento dei disturbi psicotici che possono comparire in corso di terapia del morbo di Parkinson con dopamino-agonisti e, in particolare, con L-Dopa (Pollak et al., 2004; Wood et al., 2010; Zahodne & Fernandez, 2010). In questi casi infatti i neurolettici tradizionali, che sono bloccanti D₂ prevalenti o selettivi, possono peggiorare la sintomatologia neurologica e aggravare i sintomi psicopatologici “negativi” che spesso si accompagnano alla malattia. La somministrazione di clozapina in queste circostanze si associa alla riduzione o alla regressione della sintomatologia psicotica senza aggravamento del quadro neurologico di base.

- **Disturbi da abuso di sostanze**

L'efficacia di clozapina in pazienti schizofrenici con dipendenza da sostanze in comorbidità è ben documentata in letteratura (Lubman et al., 2010).

Inoltre, in una recente review che si occupava di valutare gli effetti degli antipsicotici atipici in pazienti con sindrome di dipendenza da sostanze, clozapina è risultata efficace nel ridurre l'abuso sia di alcool che di cannabis

(Zhornitsky et al., 2010). In particolare, clozapina, in quanto antagonista diretto della dopamina, ne riduce l'effetto nello sviluppo, nel meccanismo di rinforzo e di mantenimento della dipendenza da alcool (Swift, 2010).

EFFETTI COLLATERALI E TOLLERABILITÀ

Numerosi sono gli effetti collaterali/eventi avversi che possono comportare problemi nella gestione della terapia ed eventualmente richiedere la sospensione del trattamento con clozapina.

Fra quelli molto frequenti (>1/10) vanno segnalati: eccessiva sedazione, capogiri, tachicardia, stipsi e ipersalivazione. Fra quelli frequenti (>1/100) compaiono invece: aumento di peso, alterazioni elettrocardiografiche, ipertensione e ipotensione, nausea, vomito e anoressia, alterazione degli enzimi epatici, ipertermia benigna, incontinenza urinaria e varie alterazioni neurologiche fra cui sintomi extrapiramidali, cefalea e abbassamento della soglia convulsiva (Wagstaff et al., 2003).

I più frequenti effetti collaterali della clozapina sono diretta conseguenza del suo profilo farmacologico; altri, come l'agranulocitosi, sono invece di tipo idiosincrasico e come tali difficilmente prevedibili. Sul piano della tollerabilità la clozapina si distingue per i rari e modesti effetti collaterali extrapiramidali ed è, a oggi, l'unico antipsicotico in cui il rischio di discinesia tardiva è scarso o assente (Kane, 1996), tanto da essere raccomandato come antipsicotico alternativo nel management della sindrome (Bhidayasiri & Boonyawairoj, 2010). Fin dai primi studi clinici sulla clozapina è stato possibile rilevare che il tempo di comparsa degli effetti di questo farmaco presenta un tipico andamento fasico. Angst (1971), a proposito del profilo di attività, descriveva dapprima la comparsa di una rapida e intensa azione ipnogenica e sedativa (nell'arco di

minuti o ore), cui subentrava quella sull'aggressività (nello spazio di giorni), seguita dall'effetto sulla sintomatologia produttiva (settimane) e, infine, da quello sulla sintomatologia difettuale (mesi). Anche il profilo di tollerabilità presenta un andamento a fasi differenziate, per cui la maggioranza degli effetti collaterali del farmaco si verifica nelle prime settimane o nei primi mesi di trattamento e il solo incremento ponderale e la stipsi risultano essere effetti anche tardivi (oltre l'anno di trattamento) (Hummer et al., 1995).

Di seguito verranno presentati e descritti i principali effetti collaterali che sono stati registrati in corso di trattamento con clozapina (Tabella 2).

Particolare attenzione verrà dedicata agli effetti ematologici, in quanto il rischio di una leucopenia/agranulocitosi (C.I.A., *Clozapine-Induced Agranulocytosis*) rappresenta il principale problema di sicurezza in corso di trattamento con clozapina.

Effetto collaterale	%
Sonnolenza/sedazione	34
Aumento ponderale	34
Scialorrea	23
Sintomi gastroenterici	17
Ipotensione	11
Tachicardia	7
Ipertermia	5
Convulsioni (a dosi > 600 mg/die)	4
Agranulocitosi	1

Tabella 2. *Effetti collaterali più frequentemente osservati in corso di trattamento con clozapina in 15.000 pazienti (Baldessarini e Frankenburg, 1991).*

Sedazione. Come ampiamente riportato in letteratura (Lieberman et al., 1989; Baldessarini e Frankenburg, 1991) la sedazione è il più frequente effetto collaterale della clozapina. Insorge soprattutto all'inizio del trattamento, ma, con il proseguire della cura, la maggior parte dei pazienti sviluppa rapidamente tolleranza. L'effetto sedativo della clozapina viene attribuito all'azione antistaminica e antiadrenergica del farmaco. Sul piano elettrofisiologico si registra un aumento della durata delle fasi REM a discapito del sonno a onde lente per dissociazione del rapporto non REM/REM (Elomaa, 1994).

Scialorrea. È un evento piuttosto frequente, presente in circa un quarto dei pazienti trattati con clozapina. Solitamente si manifesta precocemente e può risultare particolarmente abbondante durante il sonno. Anche per questo effetto collaterale, nel tempo si sviluppa tolleranza. La causa è probabilmente da attribuirsi all'azione agonista della clozapina sui recettori M₄ che sono prevalentemente localizzati a livello delle ghiandole salivari (Zorn et al., 1994), antitetica a quella antagonista che il farmaco esplica sugli altri recettori muscarinici. La riduzione della dose di clozapina o il trattamento con farmaci anticolinergici può alleviare il disturbo (tuttavia l'associazione con gli anticolinergici in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica va praticata con molta cautela per il rischio di sommazione di effetti centrali). È stato proposto l'uso di cerotti di scopolamina, con buoni risultati (Dreyfuss et al., 1991). Infine la scialorrea da clozapina è stata trattata con successo con la clonidina, anche in cerotti (Lieberman e Safferman, 1992).

Convulsioni. La clozapina può abbassare la soglia di convulsività (Devinsky et al., 1991; Kumlien & Lundberg, 2010). L'insorgenza delle convulsioni è dose-dipendente e può anche correlarsi alla velocità di incremento posologico all'inizio del trattamento. Il 5% circa dei pazienti che assumono più di 600 mg/die di clozapina, il 3-4% di quelli che assumono 300-600 mg/die e l'1-2% di quelli che assumono meno di 300 mg/die ha crisi comiziali associate a clozapina. Il significato predittivo di eventuali alterazioni EEG appare controverso (Tiihonen et al., 1991).

Si osservano prevalentemente crisi generalizzate tonico-cloniche, mentre più raramente sono state descritte crisi parziali senza perdita di coscienza

(Devinsky et al., 1991). Inoltre, al pari di quanto si verifica con altri antipsicotici, il rischio di convulsioni è più elevato nei pazienti con anamnesi positiva. Il farmaco quindi dovrebbe essere somministrato con cautela ai pazienti con storia di convulsioni o trauma cranico (Safferman et al., 1991). L'eventuale comparsa di convulsioni non deve necessariamente comportare una sospensione del trattamento: la terapia può essere proseguita, dopo la remissione del fenomeno, a una dose più bassa (può essere sufficiente una riduzione del 50%). In alternativa può essere aggiunto in terapia un farmaco anticonvulsivante. È da preferire l'acido valproico in quanto privo di sostanziali interazioni farmacocinetiche o farmacodinamiche con la clozapina. Non dovrebbe invece essere associata la carbamazepina per l'elevato rischio di mielosoppressione intrinseco a questa molecola. La fenitoina tende ad abbassare i livelli plasmatici di clozapina per induzione degli enzimi microsomiali epatici (Miller, 1991) e pertanto richiederebbe un adeguamento della posologia dell'antipsicotico. Infine con il fenobarbital si potrebbe osservare una sommazione dell'effetto sedativo di entrambi i farmaci (Lieberman e Safferman, 1992).

Mioclono. È stato descritto raramente in corso di trattamento con clozapina. Può verificarsi più frequentemente in pazienti con storia di convulsioni e nei casi in cui la posologia del farmaco sia stata incrementata troppo rapidamente (Lieberman et al., 1989). Alcuni autori sottolineano come possa essere considerato un sintomo premonitore di insorgenza di crisi di grande male (Berman et al., 1992). Nella maggioranza dei casi il mioclono scompare con la

riduzione della dose e solo molto raramente richiede la sospensione del trattamento.

Sindrome Maligna da Neurolettici (SMN). È stata descritta in pazienti in monoterapia con clozapina (Anderson e Powers, 1991; Das Gupta e Young, 1991; Miller et al., 1991), ma soprattutto in combinazione con altri antipsicotici. Particolare attenzione va riservata all'associazione con il litio (Pope et al., 1986; Mueller et al., 1988). Comunque l'incidenza di SMN con clozapina è molto bassa, inferiore a quella dei neurolettici tradizionali (Wagstaff et al., 1995). Lo spettro dei sintomi descritti comprende febbre con tachicardia, ipertensione, diaforesi, leucocitosi e aumento delle CPK. L'insorgenza di SMN richiede naturalmente la sospensione del trattamento.

Ipertermia. Si può verificare la comparsa di ipertermia transitoria benigna durante le prime tre settimane di trattamento. Come altri antipsicotici, infatti, la clozapina può interagire con il centro ipotalamico della termoregolazione. Di solito si tratta di aumenti di 0.5-1.5 °C, che si risolvono spontaneamente in pochi giorni. In casi rari, per elevazioni della temperatura stabilmente superiori a 38.5 °C, è opportuna la sospensione temporanea del trattamento.

Effetti sull'apparato cardiovascolare. Gli effetti collaterali a carico del sistema cardiovascolare compaiono soprattutto nelle settimane iniziali di trattamento con clozapina e, nella maggior parte dei casi, sono modesti e rapidamente reversibili. La tachicardia è solitamente dose-dipendente, con tendenza a una normalizzazione della frequenza con il prosieguo del trattamento. Può essere di tipo riflesso, cioè secondaria agli effetti ipotensivi della clozapina, ma la causa principale è l'effetto anticolinergico diretto del farmaco (Lieberman et al.,

1989; Fitton e Heel, 1990). Inoltre può essere responsabile del fenomeno anche l'elevazione della noradrenalina plasmatica conseguente al blocco dei recettori α . Raramente è stata segnalata la comparsa di altre alterazioni ECG e di disturbi della ripolarizzazione (appiattimento o inversione dell'onda T e prolungamento dell'intervallo QT).

Per quanto riguarda i casi di morte improvvisa si tratta di un rischio potenziale della terapia neurolettica in generale ed è stata descritta anche con clozapina con una incidenza sovrapponibile a quella degli altri antipsicotici (Safferman et al., 1991).

L'ipotensione si verifica generalmente all'inizio del trattamento e la sua gravità è in rapporto alla rapidità e all'entità dell'incremento posologico. I fenomeni vertiginosi e le eventuali crisi lipotimiche sono verosimilmente riconducibili all'ipotensione ortostatica. L'abbassamento della pressione arteriosa è causata principalmente dal blocco dei recettori α .

L'ipertensione è stata riscontrata soprattutto nel corso delle prime due settimane di trattamento. Si tratta comunque di un evento poco frequente.

Sono segnalati inoltre in letteratura associazione tra terapia con clozapina e il riscontro di cardiomiopatia dilatativa (Montastruc et al., 2010) e miocardite, con indicazione a controllo dei livelli di Proteina C Reattiva per le prime 4 settimane (Ronaldson et al., 2010).

Effetti comportamentali. Possono verificarsi in pazienti suscettibili, in particolare negli anziani. Comprendono confusione e, raramente, delirium. La causa va ricercata negli effetti anticolinergici della clozapina o in una escalation posologica troppo rapida (Szymanski et al., 1991). Il delirium è solitamente

reversibile mediante riduzione di dose o sospensione temporanea della clozapina con successiva graduale reintroduzione del farmaco.

Stipsi. La stipsi è riconducibile all'effetto anticolinergico della clozapina (blocco dei recettori M_1). Può essere trattata in modo sintomatico con idratanti delle feci, lassativi, supplemento di fibre e assunzione di liquidi. La costipazione è in ogni caso un serio fattore di rischio per ileo paralitico e ischemia intestinale nel trattamento con clozapine di pazienti schizofrenici (Nielsen & Meyer, 2010).

Altri sintomi da blocco colinergico sono la xerostomia e i disturbi dell'accomodazione. Pertanto la clozapina va usata con cautela e con attento monitoraggio somatico in pazienti affetti da ipertrofia prostatica, glaucoma ad angolo chiuso e altri disturbi che possono essere peggiorati da terapie ad azione anticolinergica.

Nausea e vomito. Malgrado gli antipsicotici possiedano effetti antiemetici dovuti al blocco dei recettori D_2 , con la clozapina possono insorgere nausea e, in alcuni pazienti, vomito. La nausea non sembra dipendere da un effetto diretto sul tratto gastroenterico o da eccessiva ingestione di saliva, bensì da un effetto centrale, mediato da stimolazione dopaminergica e/o serotoninergica presinaptica (Meltzer, 1990). In caso di persistenza dei sintomi può risultare utile il ricorso a farmaci antiemetici.

Effetti sull'apparato endocrino. La clozapina, diversamente dagli altri farmaci antipsicotici, non determina elevazioni della prolattina di rilievo clinico. Il debole blocco dei recettori D_2 operato dalla clozapina evita la riduzione dell'attività dopaminergica tuberoinfundibolare con mancato effetto sulla

secrezione di prolattina (Kane et al., 1981; Meltzer et al., 1979). Pertanto gli effetti secondari dell'iperprolattinemia quali amenorrea, galattorrea, ginecomastia, riduzione della libido, impotenza, non sono quasi mai rilevati in corso di trattamento con clozapina.

Il farmaco può determinare iperglicemia e ipertrigliceridemia, con elevato rischio di sviluppare la sindrome metabolica (Pramyothin & Khaodhiar, 2010). Uno studio recente ha rilevato un aumento moderato del tasso di incidenza di diabete associato a clozapina (Kessing et al., 2010). Tuttavia nella maggior parte dei pazienti che hanno sviluppato tali alterazioni metaboliche in corso di trattamento con clozapina, è stata identificata la contemporanea presenza di altri fattori predisponenti come obesità, alcolismo, storia familiare di diabete o di dislipidemia.

Incremento ponderale. L'aumento di peso corporeo rappresenta uno dei principali effetti secondari del trattamento con clozapina. Infatti clozapina è, insieme a olanzapina, l'antipsicotico di seconda generazione che determina maggior aumento di peso (Rummel-Kluge et al., 2010). Nella prima fase dell'introduzione in commercio questo problema era stato sottovalutato, alla luce dei consistenti vantaggi terapeutici nel trattamento della schizofrenia resistente e del fatto che altri precedenti farmaci antipsicotici (per es., le fenotiazine) presentavano, anche se in misura minore, questo problema. L'incremento ponderale è stato attribuito in particolare all'effetto antiserotoninergico e antistaminico da una lato e alla capacità di alterare le concentrazioni plasmatiche del cortisolo e del glucosio dall'altro (Gudellsky et al., 1987; Meltzer, 1989; Cohen et al., 1990). Anche la sedazione, con la

relativa ipomobilità, può contribuire all'aumento di peso. Per prevenire o contrastare questo effetto collaterale sono opportune adeguate norme dietetiche e l'esercizio fisico. Può risultare utile anche la riduzione posologica. Studi recenti suggeriscono l'uso di Topiramato in augmentation al fine di implementare l'effetto terapeutico e ridurre l'aumento di peso (Hahn et al., 2010).

Effetti da sospensione brusca. Sono ben documentati e compaiono rapidamente alla sospensione della clozapina (Borison et al., 1988; Palia e Clarke, 1993; De Leon et al., 1994; Musser et al., 1994). Si può assistere all'insorgenza di una sindrome colinergico-serotoninergica, con agitazione, confusione, sudorazione, diarrea, discinesia, cefalea, insonnia, nausea, irrequietezza e vomito (Simpson e Varga, 1974; Lieberman et al., 1989). È possibile anche la riacutizzazione della sintomatologia psicotica.

Pertanto è importante tenere in considerazione questi effetti da sospensione rapida nei casi in cui si debba interrompere improvvisamente il trattamento con clozapina (per esempio in caso di neutropenia). Nelle situazioni che lo consentono è dunque opportuno effettuare la sospensione in modo graduale (Cassano et al., 1996).

Effetti extrapiramidali. Caratteristica specifica della clozapina è quella di non indurre, o di indurre in misura trascurabile, effetti secondari di tipo extrapiramidale. Negli studi controllati viene riportata una modesta incidenza di tremore (6%), rigidità (3%), acatisia (3%), in misura comunque non differente da quella riscontrata nel trattamento con placebo. In realtà, nella pratica clinica, questi effetti della clozapina non si osservano quasi mai in monoterapia. Se

sono presenti vanno considerati come sequele di precedenti trattamenti con farmaci bloccanti D₂. Va infatti ricordato che il tempo di dimezzamento della sindrome da impregnazione da neurolettici accompagnata da sintomi extrapiramidali è di 1-2 mesi. Di conseguenza gli eventuali EPS non possono essere considerati dipendenti dalla clozapina prima di sei mesi di terapia.

La scarsità o assenza di EPS indotti dalla clozapina è stata attribuita in parte all'antagonismo 5HT₂, ma soprattutto alla bassa occupazione recettoriale D₂ e alla potente azione anticolinergica.

Effetti ematologici. L'agranulocitosi costituisce il più importante effetto collaterale della clozapina, quello che ne ha condizionato l'evoluzione storica e le modalità di impiego. Si definisce "neutropenia" un valore assoluto di neutrofili compreso tra 1500 e 500/mmc e "agranulocitosi" una riduzione dello stesso sotto 500/mmc. Neutropenia e agranulocitosi si verificano nell'1% dei casi trattati. In età infantile questa percentuale sembra essere superiore (2-3%). Tali fenomeni si manifestano con maggiore probabilità nei primi tre mesi di trattamento (oltre l'85% dei casi si verifica nel corso delle prime 18 settimane). Successivamente il rischio si riduce in modo netto e progressivo fino a rendere l'evento improbabile (anche se possibile) in corso di lunghi trattamenti. Infatti, se nel corso del primo anno la sua incidenza è circa del 2%, al terzo anno si riduce allo 0,12%, con un rischio sovrapponibile a quello delle fenotiazine (Kerwin, 1993). Tuttavia in letteratura sono riportati case report di leucopenia tardiva dopo 6 e 11 anni di terapia (Latif et al., 2010; Nongpiur et al., 2010).

La neutropenia da clozapina non è dose-dipendente e colpisce entrambi i sessi, anche se l'incidenza nella popolazione femminile è circa il doppio di quella maschile (Lambertenghi Delilieri, 1993).

Il meccanismo patogenetico rimane incerto. Sono state avanzate diverse ipotesi sia tossiche che immunologiche e non si può escludere un contemporaneo coinvolgimento di entrambi i meccanismi. È stata suggerita la possibilità di un'azione tossica diretta di uno dei metaboliti della clozapina (N-dimetilclozapina) piuttosto che della clozapina stessa (Gerson e Meltzer, 1992).

Alcuni studi riportano una possibile relazione con gli antigeni di istocompatibilità, in particolare con l'aplotipo HLA-B38, -DR4, -DQ3 (Yunis et al., 1995; Valevski et al., 1998) e con un polimorfismo di HLA-DQB1 (Athanasίου et al., 2010). Poiché il fenomeno non si manifesta clinicamente, se non nelle fasi avanzate di neutropenia (agranulocitosi), quando possono sopravvenire infezioni con il relativo corredo sintomatologico, la procedura di monitoraggio ematico è una condizione vincolante per la somministrazione del farmaco (Tabella 3). Le norme attuali richiedono che i controlli dei leucociti vengano effettuati ogni settimana nei primi 3 mesi di trattamento e una volta al mese successivamente. È inoltre necessario un esame ematologico completo prima di iniziare la terapia. Generalmente la neutropenia si risolve rapidamente (alcuni giorni), dopo la sospensione del farmaco (neutropenia transitoria). Solo in una minoranza di casi può evolvere in agranulocitosi (Honigfeld, 1996). La risoluzione dell'agranulocitosi, non trattata con fattori di crescita, avviene solitamente entro 14-24 giorni, in relazione alla gravità dell'evento e alla

presenza o meno di una complicazione settica (Gerson e Meltzer, 1992). Il ricorso ai fattori di crescita, che è consigliabile quando i neutrofili scendono sotto 1000/mmc, consente di dimezzare i tempi di recupero e costituisce un'ulteriore garanzia di prognosi favorevole (Geibich e Marks, 1993; Nielsen, 1993; Oren et al., 1993; Ryabik et al., 1993; Krupp e Dev, 1994).

	Leucociti	Granulociti	
Basale	> 3500	> 2000	Iniziare il trattamento.
	< 3000	≤ 1500	Non iniziare il trattamento.
Primi 6 mesi	≥ 3500	≥ 1500	Controlli settimanali. Proseguire la terapia.
	< 3500	< 1500	Sospendere la terapia. Monitorare per 4 settimane i leucociti.
	< 2000	< 1000	Sospendere la terapia. Monitorare i leucociti ogni 2 giorni.
	≤ 1000	≤ 500	Ricovero in ematologia.
Dopo 6 mesi	≥ 3500	≥ 1500	Controlli mensili. Continuare il trattamento.
	< 3500	< 1500	Sospendere la terapia. Monitoraggio per 4 settimane.

Tabella 3. Monitoraggio ematico in corso di trattamento con clozapina (Pancheri, 2003).

Per quanto riguarda la comparsa di altre alterazioni ematologiche, sono state descritte, in corso di trattamento con clozapina, leucocitosi (definita come la presenza di valori di leucociti superiori a 15.000/mmc), prevalentemente dovuta a neutrofilia (0.6%) (Lieberman et al., 1988) ed eosinofilia (1%) (Lader, 1991). Generalmente non hanno rilevanza clinica e non è stato dimostrato un loro significato prodromico in relazione a un'eventuale successiva neutropenia (Ames et al., 1995).

La leucocitosi si verifica prevalentemente nelle prime settimane di trattamento e, per la sua naturale tendenza alla remissione, non richiede la sospensione del farmaco (Naber, 1992). Prima di porre la diagnosi di leucocitosi da clozapina è comunque fondamentale escludere altre possibili cause determinanti l'evento.

Anche l'eosinofilia è un effetto collaterale iniziale del trattamento con clozapina (terza-quinta settimana), rapidamente reversibile, senza complicanze mediche o psichiatriche. Secondo alcuni autori, vi sarebbe una maggiore incidenza nelle donne (tre volte) rispetto agli uomini (Banov et al., 1993). L'eosinofilia da clozapina viene diagnosticata per esclusione di altre possibili cause.

Infine, sono stati descritti rari casi di trombocitopenia (Gerson et al., 1991). È consigliata la sospensione del trattamento con piastrine < 100.000/mmc.

DOSAGGIO E MONITORAGGIO CLINICO E PLASMATICO DELLA CLOZAPINA

La gestione dei dosaggi si basa sull'incremento progressivo da 25-50 mg/die fino a 200 mg/die in una prima fase e in un successivo aumento fino a 400-500 mg/die in caso di non risposta. In Europa il dosaggio minimo terapeutico è considerato compreso tra 200 e 300 mg/die, mentre negli Stati Uniti vengono utilizzati dosaggi medi superiori (400-600 mg/die). L'aumento del dosaggio è considerato opportuno in caso di mancata risposta sui sintomi positivi e/o sui sintomi di disorganizzazione ideativa e comportamentale. Esso appare invece scarsamente efficace sui sintomi negativi che sembrano avere una risposta soddisfacente a lungo termine anche a dosi relativamente basse (100-200 mg/die).

È stato consigliato, come guida ai dosaggi in caso di mancata risposta, il monitoraggio dei valori plasmatici di clozapina, in quanto sia gli studi iniziali che i più recenti ritengono che i livelli plasmatici di clozapina siano correlati con la risposta terapeutica.

Secondo Khan et al. (2005) il monitoraggio clinico e plasmatico di un farmaco andrebbe eseguito quando il farmaco presenta:

- meccanismi d'azione multipli;
- un metabolismo complesso (importante variabilità interindividuale);
- un basso indice terapeutico.

La clozapina presenta tutte queste caratteristiche e, per tale motivo, può risultare utile il suo dosaggio plasmatico.

Gli studi attualmente disponibili consigliano il monitoraggio terapeutico di questo antipsicotico soprattutto nelle seguenti condizioni:

- scarsa risposta clinica alle posologie standard;
- segni di tossicità o comparsa di reazioni avverse correlabili con i livelli plasmatici (per es. convulsioni, sedazione e ipotensione);
- uso concomitante di farmaci che interagiscono con il sistema del CYP450, e in particolare con il CYP1A2;
- modificazione del consumo usuale di nicotina (che tende a ridurre i livelli plasmatici di clozapina) o di caffeina (che generalmente incrementa i livelli medesimi);
- anamnesi positiva per patologie epatiche;
- scarsa compliance.

Mentre in studi condotti in precedenza non sembrava esistere un preciso rapporto tra la concentrazione plasmatica di farmaci antipsicotici e la loro efficacia clinica (Ackenheil et al., 1976; Thorup e Fog, 1977; Brau et al., 1978), indagini più recenti hanno invece permesso di ipotizzare l'esistenza di una correlazione positiva in tal senso.

In particolare, per quanto riguarda la clozapina, diversi lavori hanno indicato che ci si può attendere una migliore risposta clinica per valori plasmatici compresi tra 350-420 ng/ml (Perry et al., 1991; Hasegawa et al., 1993; Potkin et al., 1994; Miller et al., 1996).

Freeman e Oyewumi (1997) hanno invece osservato che il rischio di comparsa di effetti collaterali avversi sul sistema nervoso centrale (confusione, delirium e convulsioni generalizzate) aumenta per concentrazioni plasmatiche di clozapina superiori a 1000 ng/ml.

Bell et al. (1998) riportano che, qualora il raggiungimento dei livelli plasmatici suggeriti non sia correlato con una soddisfacente risposta clinica, si può prendere in considerazione la possibilità di aumentare la dose di farmaco somministrata, a meno che il paziente sia già in trattamento con la dose massima consentita pari a 900 mg/die, oppure insorgano eventi avversi non tollerabili.

Attualmente non sono disponibili per il metabolita norclozapina dei range di livelli plasmatici di efficacia o tossicità ai quali fare riferimento.

La notevole differenza interindividuale nella risposta clinica e nella comparsa di effetti collaterali a parità di dosaggio spesso si correla con il riscontro di livelli plasmatici di farmaco molto diversi. Inoltre le differenti concentrazioni plasmatiche di clozapina, non si sono osservate solo in pazienti diversi che assumono dosi simili, ma anche nello stesso paziente che assume dosi fisse di farmaco dopo alcune settimane di trattamento. Le cause della variabilità del tempo di risposta al farmaco non sono chiare e, ovviamente, possono essere implicati i differenti livelli plasmatici di clozapina raggiunti. Pertanto esiste la possibilità che il tempo intercorso per la comparsa della risposta al farmaco possa essere correlato con il tempo necessario per raggiungere una determinata concentrazione plasmatica stabile.

Inoltre, sulla base di queste considerazioni, è stato possibile ipotizzare che alcuni casi di mancata risposta siano una conseguenza di una bassa concentrazione plasmatica di clozapina allo steady-state (VanderZwaag et al., 1996).

In uno studio condotto su un campione di 45 pazienti è stata misurata la concentrazione plasmatica di clozapina e del suo principale metabolita norclozapina allo steady-state alla fine della dodicesima settimana di trattamento. Parallelamente è stata anche valutata la condizione psicopatologica dei pazienti attraverso la somministrazione della Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) all'inizio del trattamento e alla dodicesima settimana. La concentrazione plasmatica di clozapina risultava in media più elevata nei pazienti che rispondevano positivamente al trattamento, mentre i livelli plasmatici di norclozapina non sembravano presentare una differenza significativa nei due gruppi. È stato inoltre possibile descrivere l'esistenza di una correlazione positiva significativa tra i livelli plasmatici di clozapina e la riduzione in percentuale del punteggio ottenuto alla BPRS (Spina et al., 2000).

Tale studio ha permesso di osservare che sia l'efficacia antipsicotica che la comparsa di reazioni avverse sono correlate positivamente con le concentrazioni plasmatiche del farmaco. Sebbene un cut-off di circa 350 ng/ml possa essere preso in considerazione per prevedere la differenza tra responders e nonresponders, un apprezzabile gruppo di pazienti hanno mostrato di rispondere anche a concentrazioni più basse di questo valore.

Dalla consultazione della letteratura si evince inoltre un particolare interessante: mentre sono molti i lavori che hanno studiato i livelli plasmatici in

corrispondenza dei quali il farmaco esercita l'effetto terapeutico, sono pochi gli studi nei quali vengono suggerite le concentrazioni sieriche di farmaco che dovrebbero essere considerate tossiche. Uno studio di Ulrich et al. (2003) riporta un basso rischio di ricaduta per livelli sierici superiori a 250 ng/ml e un aumento del rischio di intossicazione per livelli superiori a 750 ng/ml.

III. LA VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA ALLA CLOZAPINA

LA VARIABILITÀ NEL SISTEMA EPATICO DEL CITOCROMO P450

Nella pratica clinica è possibile osservare una notevole variabilità interindividuale nella risposta a un farmaco con un *range* che spazia dalla mancanza di effetti clinici alla comparsa di eventi avversi o di effetti tossici. Spesso le cause di questa variabilità vanno ricercate nella differente efficienza con cui avviene il processo di biotrasformazione epatica, principale meccanismo con il quale viene regolata la concentrazione del farmaco nell'organismo e quindi, secondariamente, nel sito d'azione.

Nel nostro organismo i farmaci vengono metabolizzati e subiscono numerose modificazioni chimico-fisiche necessarie per la loro eliminazione.

Le biotrasformazioni dei farmaci sono reazioni di tipo enzimatico e possono essere classificate in due fasi. Le reazioni di fase I: ossidazione, idrolisi, riduzione, idratazione, sono dette di “funzionalizzazione” in quanto, oltre all'inattivazione della molecola, hanno lo scopo di inserire o mettere in evidenza sul substrato gruppi funzionali di legame per le successive reazioni di coniugazione. Le reazioni di fase II: glicuroconiugazione, solfatazione, metilazione, acetilazione, utilizzano i gruppi funzionali presenti sui substrati da eliminare come “terminali” per la coniugazione con diverse molecole.

Il principale responsabile delle reazioni di fase I di un'ampia varietà di composti endogeni ed esogeni è il sistema epatico del citocromo P450, una catena enzimatica di trasporto elettronico localizzata sulle membrane microsomiali del reticolo endoplasmatico liscio principalmente a livello epatico

e/o in tessuti extraepatici quali il tratto gastrointestinale, i reni, il polmone, la cute e il sistema nervoso centrale (Philpot, 1991).

La sua origine risale a più di 3,5 miliardi di anni fa: da allora la famiglia del gene del citocromo P450 si è differenziata per garantire il metabolismo di un numero crescente di composti chimici ambientali, tossine alimentari e farmaci.

La superfamiglia di enzimi che ne è derivata catalizza un'enorme varietà di reazioni di ossidazione e riduzione ed esplica la sua attività nei confronti di gruppi di substrati differenti dal punto di vista chimico (Quartesan et al., 2002).

Mediante l'applicazione di tecniche di DNA ricombinante è stato possibile chiarire più in dettaglio le caratteristiche della superfamiglia genica del citocromo P450 (CYPs). Essa comprende diverse famiglie, ciascuna composta a sua volta da numerose sottofamiglie. Nell'uomo sono state identificate 12 famiglie di geni codificanti per il citocromo P450 e spesso all'interno di una singola cellula coesistono vari sistemi enzimatici. Gli enzimi coinvolti nella maggior parte delle biotrasformazioni sono codificati dalle famiglie 1, 2 e 3 del citocromo P450 (CYP1, CYP2, CYP3). L'omologia della sequenza aminoacidica tra le varie famiglie si aggira intorno al 35%, mentre tra i membri di ciascuna famiglia varia tra il 40 e il 60%.

L'attuale nomenclatura della superfamiglia del citocromo P450 prevede la sigla "P450" seguita da un numero arabo, da una lettera alfabetica maiuscola e da un altro numero arabo, indicazioni rispettivamente della famiglia, sottofamiglia e dell'enzima (es. CYP450 1A2, CYP450 2D6, ecc).

La velocità e l'efficienza con cui lavora questo sistema enzimatico nei processi di biotrasformazione di un farmaco possono essere molto variabili da soggetto a soggetto.

Le differenze metaboliche a loro volta possono essere causate dai seguenti fattori:

- fattori fisiologici: età, sesso;
- fattori patologici: malattie epatiche;
- fattori ambientali: interazioni tra farmaci o altri composti chimici;
- fattori genetici.

Quando si utilizza un farmaco poco maneggevole come la clozapina, identificare e chiarire gli elementi che concorrono a determinare le variazioni intersoggettive nella risposta al farmaco può rivelarsi di particolare importanza ai fini di ottimizzare e “individualizzare” il trattamento.

Dopo somministrazione orale la biodisponibilità media della clozapina è compresa tra il 27 e il 47% con un coefficiente di variazione tra soggetti diversi pari a circa il 78% (Cheng et al., 1988; Choc et al., 1990).

Durante un trattamento cronico con clozapina, a causa delle differenze di biodisponibilità e di clearance del farmaco, le concentrazioni plasmatiche della molecola possono presentare una variabilità interindividuale anche di 45 volte (Potkin, 1994).

In questa tesi verrà dedicata attenzione esclusiva alle caratteristiche del citocromo P450 1A2, in quanto principale responsabile del metabolismo della clozapina sia *in vivo* che *in vitro* (Dahl, 2002).

Il CYP1A2 è uno dei principali rappresentanti tra gli enzimi appartenenti al sistema dei citocromi e costituisce circa il 13% del contenuto totale di questo gruppo di enzimi nel fegato umano (Shimada et al., 1994). Questo enzima è responsabile del metabolismo di circa il 5-10% dei farmaci attualmente in uso clinico, tra cui i più importanti sono clozapina, imipramina, caffeina, fluvoxamina, paracetamolo, phenacetin, theofillina e taurina. Il CYP1A2 inoltre è coinvolto nell'attivazione metabolica di alcune amine aromatiche e quindi espleta un ruolo primario nella carcinogenesi da tossine chimiche, come quelle presenti nel fumo di sigaretta.

Di seguito vengono esaminati in dettaglio i diversi fattori che sono in grado di modificare l'efficienza delle reazioni di biotrasformazione della clozapina e quindi possono essere chiamati in causa quali responsabili della variabilità individuale nella risposta a un trattamento con questo antipsicotico.

FATTORI FISIOLGICI E PATOLOGICI

Le reazioni di biotrasformazione dei farmaci dipendono dall'età degli individui. Gli enzimi funzionali del citocromo P450 possono essere distinti abbastanza precocemente in fase di sviluppo fetale, per quanto l'entità del metabolismo ossidativo sia inferiore a quella osservata nel periodo postnatale. I neonati sono in grado di catalizzare efficacemente la maggior parte delle reazioni di biotrasformazione di fase I, anche se la velocità di tali reazioni è inferiore a quella degli adulti. Infatti i sistemi enzimatici che catalizzano le reazioni di fase

I e II iniziano a maturare gradualmente dopo le prime due settimane di vita. Con l'avanzare dell'età si assiste a una riduzione della massa epatica, del flusso ematico e dell'attività enzimatica citocromiale, tali da condurre a una riduzione della biotrasformazione soprattutto dei farmaci che presentano un elevato coefficiente di estrazione epatica (Quartesan et al., 2002).

Anche le differenze di genere possono risultare significative. Infatti nel sesso femminile l'attività media del CYP1A2 risulta essere inferiore a quella del sesso maschile e alcuni studi riportano come l'assunzione di contraccettivi orali e la gravidanza siano associate con un decremento dell'attività enzimatica stessa (Kalow e Tang, 1991; Bologna et al., 1991).

Alcune malattie infine possono influire sull'eliminazione dei farmaci. È il caso per esempio delle epatopatie: i farmaci che subiscono un metabolismo epatico sono influenzati nella loro eliminazione dalla gravità della patologia per una diminuzione dell'attività monoossigenasica del citocromo P450 con conseguente ridotta eliminazione epatica e possibile accumulo del farmaco o dei suoi metaboliti (Quartesan et al., 2002).

FATTORI AMBIENTALI

Sono stati individuati con precisione alcuni fattori comportamentali in grado di interferire con il metabolismo della clozapina. Tra questi risultano di particolare interesse, anche in ragione della loro diffusione tra i pazienti psichiatrici, il tabagismo e l'assunzione di caffeina in dosi eccedenti la media.

Il fumo di sigaretta induce il CYP1A2, determinando un incrementato metabolismo dei substrati di questo enzima (Zevin e Benowitz, 1999; Carrillo et al., 2003; de Leon, 2004).

In particolare per quanto riguarda la clozapina, sembra che gli effetti di induzione enzimatica causati dal fumo siano più evidenti negli uomini rispetto nelle donne (Hasegawa et al., 1993). Per contro, è stato osservato che la cessazione dell'abitudine al fumo, se non si associa a una riduzione del dosaggio di clozapina, potrebbe correlarsi con un incremento della sua concentrazione plasmatica con rischio di tossicità. A tal proposito, è stato descritto il caso di un paziente in terapia con clozapina che ha sviluppato convulsioni miocloniche e crisi epilettiche generalizzate dopo poche settimane di astensione dal fumo (McCarthy, 1994). Più recentemente si è osservato un incremento medio del 72% nei livelli sierici di clozapina in 11 pazienti che avevano interrotto l'uso di sigarette. Inoltre nei pazienti in cui era stato rilevato l'incremento maggiore comparivano più frequentemente reazioni avverse (Meyer, 2001).

Anche la caffeina viene metabolizzata dal CYP1A2: è stato dimostrato che la caffeina inibisce la biotrasformazione della clozapina in quanto compete con il farmaco per il medesimo enzima (Vainer e Chouinard, 1994). Successivamente altri studi hanno precisato che tale effetto si realizza prevalentemente se la caffeina è assunta in quantità comprese tra 400 e 1000 mg/die (Hagg et al., 2000; de Leon, 2004). Il test della caffeina rappresenta un indice dell'attività metabolica del CYP 1A2 *in vivo* e viene utilizzato nella fenotipizzazione della sua attività (Özdemir et al., 2001).

Tra i fattori ambientali in grado di interferire con il metabolismo della clozapina non possono essere dimenticate le interazioni con altri farmaci.

L'uso contemporaneo di più farmaci è spesso essenziale per il raggiungimento del risultato terapeutico desiderato o per il trattamento di patologie concomitanti, soprattutto in corso di patologie psichiatriche complesse.

Per l'importanza e la frequenza che riveste la polifarmacoterapia nella pratica clinica, di seguito viene dedicato un paragrafo più approfondito riguardante il problema delle interazioni tra farmaci e il loro effetto sulla risposta clinica alla clozapina.

▪ **Le interazioni farmacologiche**

Esistono due tipi di interazioni farmacologiche: farmacodinamiche e farmacocinetiche.

Le *interazioni farmacodinamiche* si realizzano quando due sostanze condividono i medesimi siti d'azione a livello recettoriale. La contemporanea presenza di due farmaci sugli stessi recettori può tradursi in effetti additivi, sinergici o antagonisti.

Le *interazioni farmacocinetiche* riguardano invece interferenze nei processi di assorbimento, distribuzione, trasformazione metabolica ed eliminazione dei farmaci e/o dei relativi metaboliti. In particolare, nel caso di interazioni a livello metabolico, e più precisamente a livello delle isoforme del citocromo P450, si possono verificare i fenomeni di *inibizione* e di *induzione* enzimatica (Lin e Lu, 1998).

La prima eventualità si realizza quando due o più farmaci vengono metabolizzati dallo stesso enzima. Si viene in tal caso a determinare una competizione di legame per lo stesso sito enzimatico con conseguente diminuzione del grado di metabolismo del farmaco con minore affinità. I meccanismi di inibizione degli enzimi CYP450 possono essere suddivisi in tre categorie: reversibili, quasi-irreversibili e irreversibili, in dipendenza del tipo di interazione che si instaura tra enzima e substrato (farmaco o suoi metaboliti) (Halpert, 1995; Ortiz de Montellano, 1995).

Alcuni farmaci e xenobiotici sono invece in grado di indurre, sia a livello epatico che extraepatico, diversi citocromi (Okey, 1990). A differenza dell'inibizione, che rappresenta una risposta quasi immediata, l'induzione è un processo regolatorio lento, che può ridurre la concentrazione plasmatica di un farmaco, e di conseguenza comprometterne l'efficacia, in maniera tempo-dipendente. L'induzione enzimatica prevede infatti un aumento della trascrizione genica e quindi della sintesi della proteina enzimatica. Può avere il significato di una risposta adattativa che protegge le cellule da xenobiotici tossici aumentandone l'attività detossificante (Lin e Lu, 1998).

Le conseguenze più importanti dell'induzione dei CYPs nella terapia farmacologica sono:

- a) una riduzione degli effetti farmacologici in seguito a un incremento del metabolismo del farmaco;
- b) una diminuzione della tossicità, attraverso una detossificazione più rapida, o un aumento della tossicità, in seguito alla maggiore produzione di metaboliti reattivi.

In ogni caso, il verificarsi di un fenomeno di inibizione o di induzione enzimatica si può tradurre in una modificazione della concentrazione plasmatica delle molecole interessate, sia nel senso della riduzione, con conseguente diminuzione o assenza dell'effetto farmacologico desiderato, sia, al contrario, nel senso dell'aumento con possibile comparsa di eventi avversi o di fenomeni di tossicità.

Il quadro delle interazioni farmacologiche della clozapina può essere ricondotto ad alcune voci principali ed è riassunto in Tabella 4.

Innanzitutto, poiché la somministrazione di clozapina è correlata al rischio di agranulocitosi, è opportuno evitare la sua assunzione con farmaci che possano deprimere la funzione del midollo osseo. In particolare è sconsigliata l'associazione con il cotrimoxazolo e con i sulfamidici in genere, con il cloramfenicolo, gli analgesici pirazolici, la penicillamina, gli antitiroidei, gli agenti citotossici e la carbamazepina (Junghan et al., 1993).

Per quanto riguarda le *interazioni farmacodinamiche*, la clozapina può potenziare gli effetti centrali di alcool, inibitori delle MAO, antistaminici e benzodiazepine. Queste ultime in particolare vanno usate con cautela per il possibile effetto sommatorio sulla sedazione e per il rischio di depressione respiratoria. In letteratura è riportato che, nell'assunzione combinata di clozapina e benzodiazepine, risulta aumentato il rischio di arresto cardiorespiratorio, che può essere preceduto da una sindrome caratterizzata da atassia, scialorrea, sedazione e perdita di coscienza (Klimke e Klieser, 1994; Brown e Stoudemire, 1999).

Effetti additivi sono stati descritti anche con gli anticolinergici e gli antiipertensivi.

Sono note ormai da tempo numerose *interazioni farmacocinetiche* che risultano di particolare interesse nella gestione della clozapina in ambito clinico. Molte di queste interazioni dipendono dal fatto che la clozapina presenta un elevato legame con le proteine plasmatiche. L'assunzione contemporanea di altri farmaci a elevato legame proteico (per es. il warfarin) può determinare un aumento delle concentrazioni plasmatiche della clozapina. Per contro, la clozapina stessa, può spiazzare farmaci a elevato legame proteico alterandone i livelli plasmatici con possibile comparsa di effetti indesiderati.

Ai fini dello studio condotto in questa tesi, è interessante indagare le interazioni con altri farmaci o sostanze che interferiscono con il metabolismo epatico della clozapina mediato dal citocromo P450 1A2, determinando alterazioni della normale cinetica di eliminazione dell'antipsicotico con sensibili modificazione della sua concentrazione plasmatica (Spina e de Leon, 2007).

La fenitoina (Miller, 1991) o il valproato sono induttori del CYP1A2: ciò si può tradurre in una riduzione delle concentrazioni plasmatiche dell'antipsicotico con conseguente diminuzione di efficacia di dosi precedentemente attive (Brown e Stoudemire, 1999). Anche fenobarbital e carbamazepina sono induttori del CYP1A2 e del CYP3A4 (Spina e Perucca, 2002; Besag e Berry, 2006). In particolare, Facciola et al. (1998) hanno misurato concentrazioni plasmatiche di clozapina fino al 35% più basse in un gruppo di pazienti trattati contemporaneamente con clozapina e fenobarbital in confronto a un secondo gruppo di soggetti in monoterapia con clozapina. Due studi hanno invece

documentato che l'assunzione di carbamazepina può determinare una riduzione dei livelli plasmatici di clozapina anche pari al 50% (Jerling et al., 1994; Tiihonen et al., 1995).

Interessanti lavori sono stati condotti sulle interazioni farmacocinetiche con alcuni antibiotici. Tra i fluorochinoloni, la ciprofloxacina inibisce il CYP1A2 (Fuhr et al., 1992) e, come riportato da Raaska e Neuvonen (2000) in uno studio condotto su sette pazienti schizofrenici, la contemporanea somministrazione di questo antibiotico al dosaggio di 500 mg/die per una settimana si correla con l'incremento dei valori medi della concentrazione sierica di clozapina e del principale metabolita norclozapina, rispettivamente del 29 e del 31%. Tra i macrolidi, l'eritromicina è un potente inibitore del CYP3A4; in due case report viene descritto, durante la cosomministrazione di eritromicina, l'aumento dei livelli plasmatici di clozapina associato alla comparsa di effetti tossici come sonnolenza, disorientamento, capogiri, nausea e convulsioni (Funderburg et al., 1994; Cohen et al., 1996). Comunque, in uno studio successivo condotto su 12 volontari che assumevano eritromicina (1500 mg/die), è stato osservato che il profilo farmacocinetico di clozapina, somministrata contemporaneamente a basso dosaggio (12.5 mg/die), non subiva significative modificazioni a riprova del fatto che il coinvolgimento del CYP3A4 nella biotrasformazione della clozapina è da considerarsi di minore importanza (Hagg et al., 1999). La rifampicina è un induttore del CYP1A2 e del CYP3A4 (Reinach et al. 1999). In letteratura riportano l'interessante caso di un paziente schizofrenico trattato con clozapina con beneficio, in cui l'introduzione in terapia di rifampicina ha determinato un decremento dei livelli

plasmatici dell'antipsicotico con peggioramento dei sintomi psicotici (Joos et al., 1998).

Per quanto riguarda gli inibitori della pompa protonica, l'omeprazolo si comporta da induttore del CYP1A2. In due pazienti affetti da disturbo schizoaffettivo trattati con clozapina al dosaggio giornaliero di 325 mg, la cosomministrazione di omeprazolo ha comportato una riduzione dei livelli plasmatici di clozapina superiore al 40% (Frick et al., 2003). Uno studio retrospettivo ha permesso di concludere che l'effetto di induzione esercitato dall'omeprazolo sul metabolismo della clozapina è da ritenersi significativo solo in pazienti non fumatori (Mookhoek e Loonen, 2004).

La cimetidina si comporta invece da inibitore del CYP1A2 e può dunque determinare un aumento dei livelli plasmatici di clozapina con possibile comparsa di effetti collaterali (Cassano et al., 1996).

Recentemente è stata avanzata l'ipotesi che anche i contraccettivi orali interferiscano con il metabolismo della clozapina attraverso l'inibizione del CYP1A2, del CYP2C19 e del CYP3A4 (Gabbay e O'Dowd, 2002).

In ambito psichiatrico, particolare attenzione va riservata alle interazioni con gli SSRI. Infatti queste sostanze sono in grado di esercitare importanti effetti inibitori sul sistema metabolico dei citocromi (Spina e de Leon, 2007). Ciascuno dei farmaci appartenenti a tale gruppo mostra inoltre di possedere una specificità nella potenza di inibizione di determinate isoforme tra le tante comprese nel sistema dei citocromi.

Fluoxetina e paroxetina sono potenti inibitori del CYP2D6 e fluvoxamina del CYP1A2 e del CYP2C19 (Brosen et al., 1993). La somministrazione di

fluoxetina al dosaggio giornaliero di 20 mg si associa con un aumento nella concentrazione plasmatica della clozapina di circa il 40-70% proprio a causa della potente inibizione che la molecola esplica sull'attività del CYP2D6 (Centorrino et al., 1994; Spina et al., 1998). Per quanto riguarda invece l'effetto della fluvoxamina, numerose indagini farmacocinetiche hanno permesso di dimostrare che la concomitante somministrazione di questa sostanza può comportare un aumento di 5-10 volte dei livelli plasmatici di clozapina (Hiemke et al., 1994; Jerling et al., 1994; Dequardo e Roberts, 1996; Dumortier et al., 1996; Koponen et al., 1996; Wetzel et al., 1998; Szegedi et al., 1999; Fabrazzo et al., 2000).

Questi dati si rivelano di particolare interesse clinico nel momento in cui si osserva che, in corso di cosomministrazione di clozapina con farmaci SSRI, l'incremento dei livelli plasmatici dell'antipsicotico si correlano con l'insorgenza di eventi avversi. A tal proposito è stata descritta la comparsa di effetti collaterali di tipo extrapiramidale in alcuni pazienti trattati contemporaneamente con clozapina e fluvoxamina (Kuo et al., 1998). Tale interazione è stata attribuita proprio all'inibizione esercitata dalla fluvoxamina principalmente sul CYP1A2, ma anche sul CYP2C19 e sul CYP3A4 (Shader e Greenblatt, 1998; Olesen e Linnet, 2000). Gli autori concludono che è importante mantenere monitorati tali pazienti ed eventualmente valutare l'opportunità di una riduzione del dosaggio dell'antipsicotico (Szegedi et al., 1995; Lammers et al., 1999).

Fluoxetina e fluvoxamina inoltre inibiscono moderatamente l'attività del CYP2C9 (Schmider et al., 1997) e del CYP3A4 (Greenblatt et al., 1996;

McGinnity et al., 2006), mentre sertralina svolge un effetto analogo sul CYP2D6 (Crewe et al., 1992). Due studi riportano un incremento moderato della concentrazione plasmatica di clozapina dopo somministrazione di sertralina alle dosi rispettivamente di 50 e 300 mg/die (Chong et al., 1997; Pinninti e de Leon, 1997). Citalopram ed escitalopram, infine, non sembrano possedere specifiche capacità di inibizione degli enzimi microsomiali epatici (Taylor et al., 1998; Avenoso et al., 1998). Tuttavia è stato descritto un caso in cui si è verificato un incremento dei livelli plasmatici di clozapina dopo cosomministrazione di citalopram probabilmente per inibizione del CYP1A2 o del CYP3A4 da parte di quest'ultimo farmaco (Borba e Henderson, 2000).

I dati che riguardano le interazioni metaboliche tra la clozapina e la paroxetina sono invece contraddittori. Alcuni studi documentano un aumento moderato della concentrazione plasmatica dell'antipsicotico (20-40%) in seguito alla somministrazione di paroxetina al dosaggio di 20 mg/die, sempre per inibizione del CYP2D6 (Centorrino et al., 1996; Spina et al., 2000), mentre altri sostengono che tale incremento non debba essere considerato significativo (Wetzel et al., 1998).

In conclusione, l'inibizione del metabolismo della clozapina da parte degli SSRI si correla quasi costantemente con un incremento dei livelli plasmatici del farmaco e conseguente aumento della probabilità di comparsa di effetti collaterali quali sedazione, ipotensione ortostatica e scialorrea fino alla comparsa di una vera e propria sindrome anticolinergica (Markowitz et al., 1996; Lammers et al., 1999).

Infine è importante segnalare che la cosomministrazione di clozapina e antidepressivi triciclici è stata associata con la comparsa di gravi sintomi di tipo anticolinergico, mentre la combinazione di clozapina e litio o carbamazepina può determinare l'insorgenza di sindrome maligna da neurolettici (Baldessarini e Frankenburg, 1991; Brown e Stoudemire, 1999). L'associazione con il litio può aumentare anche il rischio di crisi comiziali, confusione mentale e disturbi del movimento.

Farmaci inibitori della mielogenesi	Possibile azione sinergica sull'agranulocitosi.
Carbamazepina	Possibile, anche se non dimostrata, azione sinergica sull'agranulocitosi.
Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Sertralina	Alcuni studi hanno dimostrato un'elevazione plasmatica di clozapina, più accentuata con fluvoxamina.
Antidepressivi Triciclici Fenotiazine Altri farmaci metabolizzati dal citocromo P450	Nel 3-10% dei casi vi è una ridotta attività del citocromo P450, comune metabolizzatore di questi farmaci e della clozapina. Di conseguenza, i valori plasmatici di quest'ultima tendono ad aumentare.
Benzodiazepine	Vi può essere azione sedativa sommatória.
Antipertensivi	Vi può essere azione ipotensiva sommatória.
Anticolinergici	Vi può essere azione anticolinergica sommatória.
Anticonvulsivanti	La clozapina può abbassare la soglia anticonvulsivante e di conseguenza ridurre l'efficacia di trattamenti antiepilettici in atto.

Tabella 4. *Interazioni farmacologiche di clozapina (Pancheri, 2003).*

FATTORI GENETICI

Il ruolo svolto dai fattori genetici nel determinare differenze interindividuali nella risposta ai farmaci è ormai ampiamente documentato.

Già Vessel nel 1989 notò come le differenze nella risposta clinica alla somministrazione del medesimo farmaco fossero più marcate tra due o più soggetti rispetto alle differenze che si potevano riscontrare nello stesso soggetto in momenti diversi del trattamento oppure tra gemelli omozigoti. È stato successivamente stimato che tali differenze sono dovute a fattori di ordine genetico in più del 90% dei casi (Kalow, Tang e Endrenyi, 1998). Più recentemente in uno studio si è registrato il seguente dato: le concentrazioni plasmatiche di una sostanza somministrata alla stessa dose in due soggetti di uguale peso e altezza possono subire variazioni anche superiori a 600 volte (Eichelbaum et al., 2006).

Quindi si può considerare che sebbene fattori non genetici, come è stato chiarito nei paragrafi precedenti, possano influenzare la risposta ai farmaci, esiste un numero sempre crescente di osservazioni che rivelano come i fattori genetici siano responsabili delle più significative modificazioni dei processi farmacodinamici e farmacocinetici a cui vanno incontro i farmaci nell'organismo (Evans e Relling, 1999; Evans e Johnson, 2001; Ng et al., 2004).

In questa tesi verrà dedicata attenzione particolare ai fattori genetici che influenzano gli aspetti farmacocinetici, con riferimento specifico alla variabilità

nell'attività degli enzimi farmaco-metabolizzanti (Drug Metabolizing Enzymes - DMEs). Infatti è possibile affermare che la maggior parte delle modificazioni farmacocinetiche di natura genetica attualmente conosciute riguarda proprio le differenze intersoggettive nel contenuto e nell'attività delle varie isoforme del citocromo P450 nel fegato.

L'individuazione e la caratterizzazione delle variazioni nella risposta ai farmaci dovute a fattori ereditari è oggetto di studio di una disciplina nota appunto come "farmacogenetica".

▪ **La farmacogenetica e la farmacogenomica**

In letteratura compaiono varie definizioni di "farmacogenetica" e "farmacogenomica".

La *farmacogenetica* è un settore della ricerca farmacologica apparso fin dagli anni '50 con Arno Motulsky, che aveva indicato nella variazione genetica l'origine delle differenze individuali nella risposta al trattamento farmacologico con primachina a causa di polimorfismi nella glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Il termine "farmacogenetica" fu poi effettivamente introdotto in medicina da Vogel nel 1959, per indicare la scienza che si occupa delle basi genetiche della variabilità nella risposta ai farmaci.

La *farmacogenomica* è la parte della farmacologia che, avvalendosi delle conoscenze sviluppate dalla genetica, dalla biologia molecolare e dal progetto Genoma Umano, ottimizza la scelta e la dose di un farmaco in modo tale che la terapia adottata sia la più adatta per ciascun individuo suddividendo la

popolazione di pazienti sulla base del loro profilo genetico (Aitchison e Gill, 2003).

La farmacogenetica rappresenta quindi lo studio delle risposte qualitativamente e quantitativamente abnormi ai farmaci che riconoscono alla loro base un'alterazione genetica. Il patrimonio genetico individuale può determinare differenze nell'espressione o nell'attività di molecole dell'organismo coinvolte nel metabolismo dei farmaci che rendono conto di risposte abnormi sia in termini farmacodinamici che farmacocinetici. Di conseguenza, alcuni farmaci, tollerati dalla maggior parte dei pazienti, in soggetti geneticamente predisposti, vanno incontro a una fase farmacocinetica modificata o manifestano un'attività farmacodinamica abnorme con comparsa di risposte cliniche imprevedibili e spesso piuttosto gravi. Nella pratica clinica si possono dunque osservare effetti terapeutici ridotti, o addirittura assenti, e reazioni avverse in alcuni pazienti rispetto ad altri nonostante sia stato somministrato lo stesso farmaco alla stessa posologia.

Le conoscenze apprese dal crescente sviluppo di queste discipline sono state applicate anche alla psichiatria e, in particolare, allo studio della variabilità individuale nella risposta clinica agli antipsicotici.

▪ **I polimorfismi del citocromo P450 1A2**

Il termine *polimorfismo genetico* definisce un carattere monogenico presente nella popolazione in almeno due diversi fenotipi (e verosimilmente in almeno

due genotipi), di cui il più raro con frequenza di almeno 1-2% (Daly et al., 1993).

L'allele che conferisce il carattere di "funzionamento metabolico normale" si definisce "*wild type*" (*wt*); gli alleli mutanti differiscono da quest'ultimo a causa del sopravvenire di una mutazione puntiforme, di una delezione o di una duplicazione. La variazione minima che può generare un polimorfismo è il cambiamento di una singola base del DNA. Si parla in questo caso di "polimorfismi di singolo nucleotide" (Single Nucleotide Polimorphisms, SNPs). Gli SNPs costituiscono il tipo di variazione genetica più comune nell'uomo: rappresentano, infatti, il 90% di tutti i polimorfismi (Kao et al., 2000).

I polimorfismi genetici relativi agli enzimi metabolizzanti i farmaci si traducono nella produzione di varianti enzimatiche ad attività ridotta o nulla o, al contrario, ad attività molto elevata, rispetto alla norma.

Ciò potrebbe giustificare l'osservazione nella popolazione di fenotipi con differente capacità metabolica e avere importanti risvolti clinici e tossicologici.

Per quanto riguarda più in dettaglio il CYP450 1A2, recenti studi hanno dimostrato che quest'enzima è espresso a vari livelli nel fegato tra differenti individui, suggerendo appunto un controllo polimorfico della sua attività (Lewis et al., 2004).

Il gene del CYP1A2 è localizzato sul cromosoma 15 (Jaiswal et al., 1987). Per questo gene sono stati descritti 37 polimorfismi, per sette dei quali (*1C; *1F; *1K; *3; *4; *6; *7) è stato possibile dimostrare degli effetti *in vivo*. I

polimorfismi *1K, *3, *4, *6, *7, mostrano nei soggetti Caucasici una frequenza allelica inferiore all'1%, mentre *1F e *1C, con una frequenza allelica del 70% e del 5-10% rispettivamente, hanno destato particolare interesse nei ricercatori e si sono rivelati in grado di determinare variazioni funzionali dell'attività enzimatica. Lo SNP CYP1A2*1C consiste nella sostituzione di una guanina in posizione -3960 con una adenina a livello della regione promotore: questa sostituzione porta a una significativa riduzione dell'inducibilità dell'enzima (Nakajima et al, 1999). Lo SNP CYP1A2*1F consiste nella sostituzione di una citosina in posizione -163 con una adenina nell'introne 1: ciò causa un aumento dell'inducibilità dell'enzima con relativo aumento della metabolizzazione in vivo della caffeina (reviewed in Ingelman-Sundberg et al., 2007).

È stato inoltre osservato che le mutazioni più spesso chiamate in causa per spiegare le differenze interindividuali nell'attività e nell'inducibilità del CYP1A2 interessano solitamente la *regione promotrice* del gene del CYP1A2, mentre i polimorfismi relativi al tratto di gene che codifica per la proteina enzimatica vera e propria sono complessivamente rari e sembrano coinvolti solo occasionalmente nel determinare la riduzione di attività dell'enzima *in vivo* (Faber et al., 2005).

▪ **Fenotipizzazione e genotipizzazione del citocromo P450 1A2**

La capacità metabolica individuale può essere determinata mediante test di fenotipizzazione, oppure mediante tipizzazione genetica.

La prima metodica consiste nel somministrare una singola dose orale di un *marker* che sia noto come substrato specifico dell'enzima di cui si intende indagare l'attività e nella successiva misurazione delle concentrazioni di tale sostanza o di un suo metabolita in materiali biologici facilmente reperibili come il plasma, la saliva o le urine.

Per lo studio dell'attività del CYP1A2 il *marker* più frequentemente utilizzato è la caffeina.

Attualmente le potenziali applicazioni delle metodiche di fenotipizzazione del CYP1A2 sono le seguenti (Faber et al., 2005):

- studi di fase I su volontari;
- studi epidemiologici su soggetti sani e/o malati;
- indagini condotte su pazienti che debbano iniziare un trattamento con una sostanza il cui metabolismo dipende prevalentemente dal CYP1A2 per una determinazione *a priori* della dose più efficace;
- pazienti nonresponders o che manifestano reazioni avverse in corso di trattamento con farmaci il cui metabolismo dipende prevalentemente dal CYP1A2;
- valutazione aggiuntiva e/o per un follow-up sulla funzionalità del fegato in pazienti affetti da epatopatie;
- adattamento del dosaggio farmacologico in soggetti tabagisti che abbiano interrotto l'abitudine al fumo di sigaretta o in caso di introduzione in terapia di sostanze in grado di interferire in modo importante con l'attività del CYP1A2 (per es. la fluvoxamina) (Carillo et al., 1995; Olesen et al., 1996; Zullino et al., 2002; Faber e Fuhr, 2004).

Inoltre la fenotipizzazione enzimatica può contribuire a distinguere i pazienti che non rispondono al trattamento da quelli con scarsa compliance (Özdemir et al., 2001; Carillo et al., 2003; Shirley et al., 2003).

La genotipizzazione invece si avvale di tecniche di biologia molecolare condotte sul DNA estratto dalle cellule ematiche e successivamente sottoposto ad amplificazione tramite PCR (*Polymerase-chain reaction*).

I test di genotipizzazione mostrano di possedere numerosi vantaggi:

- permettono l'identificazione delle principali varianti alleliche degli enzimi polimorfici;
- sono dotati di una minima invasività in quanto è sufficiente un unico prelievo di pochi ml di sangue;
- sono privi dei possibili rischi connessi con la somministrazione di sostanze esogene come avviene invece per i test di fenotipizzazione.

La genotipizzazione del CYP1A2 può avere importanti implicazioni cliniche nel trattamento di pazienti con clozapina. A questo proposito è interessante riportare i risultati dello studio condotto su quattro pazienti fumatori trattati con clozapina che risultavano essere nonresponders ai comuni dosaggi utilizzati in ambito clinico e mostravano concentrazioni plasmatiche del farmaco più basse rispetto a un gruppo di pazienti di riferimento (Eap et al., 2004). Attraverso il sequenziamento del DNA dei pazienti nonresponders, è stato possibile individuare la presenza della variante allelica CYP1A2*1F (Sachse et al., 1999; Han et al., 2000; Han et al., 2001). Come chiarito in precedenza, tale polimorfismo conferisce il carattere di alta inducibilità al citocromo, soprattutto in soggetti fumatori, con incremento dell'attività dell'enzima CYP1A2,

aumento della velocità metabolica e conseguente riscontro di ridotti livelli plasmatici di clozapina in tali pazienti.

In ambito clinico questo studio ha permesso di osservare che nei pazienti individuati come metabolizzatori ultrarapidi il livello plasmatico di clozapina risultava costantemente troppo basso nonostante il farmaco fosse somministrato ai comuni dosaggi terapeutici. Nell'ambito del medesimo lavoro viene riportato anche che gli stessi pazienti mostravano un miglioramento clinico nel momento in cui si riuscivano a ottenere concentrazioni plasmatiche di clozapina più elevate attraverso due strategie: incremento della dose giornaliera somministrata (per es., sopra 1400 mg/die) o introduzione in terapia di fluvoxamina (potente inibitore del CYP1A2) a basso dosaggio (50-100 mg/die).

▪ **Differenze etniche nella risposta alla clozapina**

Le differenze nella risposta alla clozapina e soprattutto nella sensibilità a manifestare alcuni eventi avversi sono particolarmente evidenti se si confrontano pazienti di diversa origine etnica.

Per esempio, alcuni studi riportano che nella razza Caucasica è necessaria la somministrazione di clozapina a dosaggi mediamente più alti rispetto agli Asiatici per raggiungere concentrazioni plasmatiche efficaci (Matsuda et al., 1996; Chang et al., 1997; Ng et al., 2005). Si è osservato infatti che gli Asiatici, tendono a mantenere un rapporto tra il livello plasmatico di clozapina e la dose somministrata significativamente più alto rispetto ai pazienti di razza

Caucasica, indipendentemente dalla presenza di fattori interferenti come il peso corporeo, il fumo di sigaretta o l'assunzione di caffeina (Ng et al., 2005).

Per quanto riguarda altri gruppi etnici, gli Afroamericani mostrano una più marcata sensibilità ad alcuni effetti collaterali della clozapina come l'aumento di peso (de Leon et al., 2007). Anche per loro inoltre, sono generalmente sufficienti dosaggi più bassi rispetto alle popolazioni Caucasiche (Kelly et al., 2006).

Alcune di queste differenze si possono spiegare ricorrendo a variazioni farmacocinetiche dovute a polimorfismi dei DMEs, ma possono essere coinvolte anche differenze farmacodinamiche, quali i polimorfismi dei recettori dopaminergici, istaminergici e muscarinici (Hwang et al., 2005).

IV. STUDIO SPERIMENTALE

PREMESSE E SCOPO DEL LAVORO

Il nostro studio rappresenta un ulteriore approfondimento circa il possibile ruolo dei fattori genetici del CYP1A2 nella risposta clinica alla clozapina, con particolare riferimento all'insorgenza di reazioni avverse, e si inquadra all'interno del filone di ricerca di Farmacogenetica del Dipartimento di Medicina Clinica- Sezione Farmacologia dell'Università degli Studi dell'Insubria. Infatti, come è stato chiarito precedentemente, la clozapina è metabolizzata per il 70% dal citocromo CYP1A2 (Bertilsson et al., 1994; Özdemir et al., 2001).

Per il gene del CYP1A2 sono stati identificati 16 polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) (<http://www.imm.ki.se/7CYPalleles/cyp1a2.htm>). Fra questi, due in particolare possiedono una frequenza allelica superiore all'1-2% nei soggetti Caucasici e potrebbero pertanto risultare importanti nel determinare variazioni funzionali dell'attività enzimatica (Fuhr et al., 1994; Wang & Zhou, 2009; Zhou et al., 2010):

- l'allele **CYP1A2*1C**, la cui frequenza allelica nella popolazione caucasica è del 5-20% (Todesco et al., 2003), è il risultato di una mutazione puntiforme che consiste nella sostituzione di una guanina in posizione -3860 con una adenina ed è associato a una ridotta inducibilità rispetto all'allele *wt* (CYP1A2*1) con possibile diminuzione dell'attività metabolica;
- l'allele **CYP1A2*1F**, la cui frequenza allelica nella popolazione caucasica è del 68% (Todesco et al., 2003), è il risultato di una mutazione puntiforme che consiste nella sostituzione di una citosina in posizione -163 con una

adenina e si associa a una aumentata induzione enzimatica, particolarmente nei fumatori (Eap et al., 2004).

La variazione dell'attività enzimatica (cioè dell'effetto fenotipico) del CYP1A2 in base alla presenza di uno o due alleli polimorfici *C o *F, considerati separatamente, è schematizzata nella tabella 5.

	Attività enzimatica attesa
*F	
*1/*1	-
*1/*F	↑
*F/*F	↑↑
*C	
*1/*1	-
*1/*C	↓
*C/*C	↓↓

Tabella 5. *Variazione dell'attività enzimatica del CYP1A2 in base alla presenza dei singoli polimorfismi *F e *C.*

Tuttavia, la valutazione complessiva del funzionamento enzimatico del CYP1A2 richiede di considerare anche l'effetto complessivo di entrambi i polimorfismi. È infatti possibile ipotizzare che la presenza del polimorfismo *C e/o la contemporanea assenza del polimorfismo *F si correli con un'attività dell'enzima CYP1A2 complessivamente più bassa.

Per definire l'attribuzione dell'effetto metabolico delle diverse combinazioni abbiamo utilizzato i seguenti termini (vedi anche tabella 6):

- **Rapid Metabolizer (RM)**, ossia metabolizzatori rapidi, portatori di almeno 3 su 4 alleli associati ad aumento del metabolismo ($*F/*F - *1/*1$; $*F/*F - *1/*C$; $*1/*F - *1/*1$);
- **Slow Metabolizer (SM)**, ossia metabolizzatori lenti, portatori di almeno 3 su 4 alleli associati a riduzione relativa del metabolismo ($*1/*1 - *C/*C$; $*1/*1 - *1/*C$; $*1/*F - *C/*C$) o portatori di 2 alleli associati ad aumento relativo del metabolismo e 2 alleli associati a riduzione relativa del metabolismo ($*1/*1 - *1/*1$; $*F/*F - *C/*C$; $*1/*F - *1/*C$).

genotipo			fenotipo
CYP1A2*1C		CYP1A2*1F	
C	+	W	SM
E	+	W	
C	+	E	
W	+	W	
C	+	F	
E	+	E	
W	+	F	RM
E	+	F	
W	+	E	

Tabella 6. Definizione delle diverse combinazioni alleliche. W, soggetti omozigoti per il genotipo wild tipe. E, soggetti eterozigoti. C e F, soggetti omozigoti rispettivamente per i polimorfismi CYP1A2*1C e CYP1A2*1F. SM, slow metabolizer; RM, rapid metabolizer.

L'ipotesi alla base di questo lavoro è che i soggetti portatori di polimorfismi genetici che si correlano con una diminuzione dell'attività enzimatica del

CYP1A2 possano mostrare una maggiore suscettibilità alle Reazioni Avverse (RA) durante il trattamento con clozapina anche a bassi dosaggi, oltreché alle normali posologie. In particolare, la presenza di un fenotipo SM, realizzerebbe una condizione in cui la clozapina verrebbe metabolizzata con minor efficienza a livello epatico, con conseguente aumento della biodisponibilità del farmaco e raggiungimento di concentrazioni plasmatiche potenzialmente tossiche. Nella pratica clinica, l'impiego dei fattori genetici nella previsione della risposta clinica alla clozapina potrebbe consentire una riduzione dei dosaggi in quei pazienti che presentano una combinazione allelica associata a ridotta capacità metabolica e conseguente aumento del rischio di RA indotte dal trattamento e viceversa la possibilità di utilizzare dosaggi maggiori (ove necessari) nei soggetti che presentano un profilo genetico associato ad elevata attività metabolica. Inoltre poiché i SNPs di nostro interesse sono localizzati nella regione promoter del gene potrebbero essere responsabili di una diversa espressione del RNA messaggero (mRNA) del CYP1A2, che verrà pertanto utilizzato come un marker funzionale dell'attività del citocromo. L'analisi dei livelli di espressione del mRNA verrà effettuata a livello dei linfociti circolanti, essendo questa una fonte relativamente facile da ottenere ed economica.

L'obiettivo di questo studio è valutare, in una popolazione di pazienti schizofrenici in trattamento con clozapina, l'eventuale correlazione tra la comparsa di RA che conducono alla sospensione della terapia o alla riduzione della posologia e la presenza di polimorfismi del CYP1A2 e/o i livelli di espressione del mRNA nei linfociti.

MATERIALI E METODI

▪ Disegno dello studio

La ricerca descritta in questa tesi è stata condotta dal Dipartimento di Medicina Clinica dell'Università degli Studi dell'Insubria. Il presente è uno studio osservazionale, retrospettivo, genetico, ed è stato effettuato reclutando soggetti utenti del DSM (Dipartimento di Salute Mentale) di Varese, afferenti alle strutture ambulatoriali e residenziali della UOP I del Verbano, UOP II di Varese e UOP III di Azzate. Il protocollo è stato sottoposto e approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera dell'Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi di Varese.

▪ Descrizione del campione

I pazienti sono stati ritenuti idonei per l'arruolamento in questo studio in presenza delle seguenti caratteristiche:

- diagnosi di Schizofrenia o di altro Disturbo Psicotico in base al DSM IV-TR (APA, 2002);
- trattamento in corso con clozapina da almeno sei mesi, oppure trattamento progressivo interrotto a causa dell'insorgenza di RA;
- funzionalità epatica e renale nella norma;
- assenza di patologie organiche concomitanti;
- pazienti in grado di firmare un consenso informato;

- assenza di contemporanea assunzione di sostanze in grado di indurre o inibire l'attività del CYP1A2, eccetto l'abitudine al fumo di sigaretta.

Per ogni paziente è stato condotto un colloquio, da parte del personale medico, finalizzato alla raccolta dei seguenti dati:

- acquisizione del consenso informato;
- raccolta dei dati socio-demografici;
- anamnesi familiare;
- anamnesi medica generale: anamnesi fisiologica, patologica prossima, patologica remota;
- anamnesi psicopatologica;
- anamnesi farmacologica: data di inizio del trattamento con clozapina, posologia, dati relativi alle modificazioni del dosaggio o alla sospensione della terapia. Inoltre sono state registrate informazioni su eventuali terapie internistiche in atto e sulla terapia psicofarmacologica assunta prima e/o in concomitanza del trattamento con clozapina. Infine è stata riservata particolare attenzione all'assunzione di altri xenobiotici in grado di modificare l'attività enzimatica del CYP1A2, in particolare il fumo di sigaretta;
- intervista specificamente orientata alla rilevazione degli effetti collaterali correlati al trattamento con clozapina. L'attribuibilità delle RA al trattamento con clozapina deve essere confermata dai criteri del WHO (WHO Uppsala Monitoring Centre - UMC; <http://www.who-umc.org>) come indicato di seguito:

- **CERTA.** Quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una plausibile sequenza temporale dall'assunzione del farmaco e che non può essere spiegato dalla malattia per il quale il farmaco è impiegato, né dalla concomitante assunzione di altri farmaci o sostanze chimiche. La reazione deve essere già stata osservata per il farmaco sospettato. La reazione deve migliorare con il dechallenge e ricomparire con il rechallenge.
- **PROBABILE.** Quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una plausibile sequenza temporale dall'assunzione del farmaco e che non può essere spiegato dalla malattia per il quale il farmaco è impiegato, né dalla concomitante assunzione di altri farmaci o sostanze chimiche. La reazione deve essere già stata osservata per il farmaco sospettato. La reazione deve migliorare con il dechallenge. Non è necessario il rechallenge perché la reazione avversa rientri in questa definizione.
- **POSSIBILE.** Quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una plausibile sequenza temporale dall'assunzione del farmaco e che non può essere spiegato dalla malattia per il quale il farmaco è impiegato, né dalla concomitante assunzione di altri farmaci o sostanze chimiche. La reazione deve essere già stata osservata per il farmaco sospettato. Non è necessario avere informazioni sull'effetto del dechallenge.
- **IMPROBABILE.** Quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che insorge con una sequenza temporale

dall'assunzione del farmaco che rende improbabile una connessione causale o in cui altri farmaci o sostanze chimiche o la malattia del paziente possono spiegare l'evento osservato.

- **CONDIZIONATA/INCLASSIFICATA.** Quando è un evento (inclusa l'alterazione di un parametro di laboratorio) che viene riportato come una reazione avversa, che necessita di più dati per una appropriata valutazione o per la quale si stanno valutando dati ulteriori.
- **NON VALUTABILE/INCLASSIFICABILE.** Una segnalazione che riporta una reazione avversa che non può essere giudicata a causa della mancanza o contraddittorietà delle informazioni e che non può essere verificata o supportata da altre informazioni.

La valutazione di quest'ultimo aspetto è stata accompagnata anche dalla somministrazione della Liverpool University Neuroleptic Side-Effect Rating Scale – LUNSERS (per prendere visione della scala si rimanda all'Appendice).

La LUNSERS è una scala che permette di valutare la prevalenza e l'intensità degli effetti collaterali conseguenti alla terapia con antipsicotici attraverso una stima della percezione soggettiva della tollerabilità di tali farmaci. È una scala di facile comprensione, dunque può essere compilata dal paziente in autonomia o, se necessario, con l'assistenza del medico o di un altro operatore (Day et al., 1995). Si compone di un elenco di 51 items, ciascuno dei quali propone un effetto collaterale. Le domande riguardano sintomi di diversa natura: psichici, ormonali, extrapiramidali, anticolinergici, reazioni allergiche e "miscellanea". Il paziente deve indicare a fianco di ogni item con quale frequenza ha

manifestato ciascun evento avverso nell'ultimo mese, scegliendo tra le seguenti possibilità: assente, poco, abbastanza, molto o moltissimo. A ciascuna risposta viene poi assegnato un punteggio da 0 per la risposta "assente" a 4 per "moltissimo". Nell'elenco sono compresi dieci items cosiddetti "red herring" ("false piste"), che suggeriscono eventi avversi che non si correlano con un trattamento antipsicotico in atto. Le "red herring" corrispondono alle domande numero: 3, 8, 11, 12, 25, 28, 30, 32, 42, 45. Tali items sono introdotti allo scopo di appurare l'accuratezza e l'affidabilità delle risposte riportate dai pazienti.

La LUNSERS viene considerata un strumento valido per la valutazione degli effetti collaterali generali della terapia con antipsicotici e può essere utilizzata sia per gli antipsicotici tipici che per gli atipici (Walker et al., 2005).

▪ **Reperimento dei campioni biologici ed estrazione del DNA**

Ogni paziente è stato sottoposto a un prelievo di 3 ml di sangue intero in EDTA. I campioni di sangue sono stati prelevati dal personale infermieristico presso le Comunità per i pazienti ivi residenti al momento dell'arruolamento e presso i rispettivi CPS per i soggetti trattati a livello ambulatoriale.

I campioni ottenuti sono stati analizzati dalla Sezione di Farmacologia Sperimentale e Clinica del Dipartimento di Medicina Clinica dell'Università degli Studi dell'Insubria. In questa sede è stata eseguita l'estrazione del DNA genomico utilizzando una metodica standard di estrazione su colonna (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada). Al termine del processo di estrazione i

campioni sono stati quantificati tramite analisi spettrofotometrica a una lunghezza d'onda di 260 nM e quindi conservati a -80°C fino al momento dell'analisi genetica.

▪ **Identificazione dei polimorfismi nel gene CYP1A2 mediante Real-Time PCR**

L'analisi dei polimorfismi è stata effettuata mediante Real-Time PCR compiuta utilizzando chimica Applied Biosystems. La tecnica si basa sulla creazione di due sonde, ognuna in grado di riconoscere una forma allelica, marcate con due differenti fluorocromi (la sequenza di primers e sonde è riportata in tabella 8). La reazione di RT-PCR è effettuata utilizzando un termociclatore ABI prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

CYP1A2*F	Sense Primers	TTTCCAGCTCTCAGATTCTGTGAT
	Reverse Primers	GGATACCAGAAAGACTAAGCTCCATC
	sonda wt	VIC-CTCTGTGGGCCAGGACGCAT
	sonda mut	FAM-TCTGTGGGCACAGGACGCATG G
CYP1A2*C	Sense Primers	CACAACGGGACTTCTTGGAT
	Reverse Primers	GGTGACTCACACCTGTAATTCTA
	sonda wt	VIC-CCAGCTACTCGGGAAGCTGGGGCATG
	sonda mut	FAM-AATTGCTTGAATCCGAGAGGCGG

Tabella 8. *Primers e sonde utilizzate per la genotipizzazione mediante Real-Time PCR (Casley et al., 2006)*

▪ Espressione del CYP1A2 mRNA

I livelli del CYP1A2 mRNA sono stati valutati nei linfociti periferici attraverso la Real Time PCR utilizzando un Kit Assay on Demand per il gene CYP1A2 (Applied Biosystems, Foster City, USA) seguendo le istruzioni dei fornitori. I risultati sono stati analizzati utilizzando il programma ABI prism SDS (Applied Biosystem). Il programma ha fornito i valori del “ciclo soglia” (cycle threshold - CT) che è il punto sulla curva (flesso) in cui l'intensità di fluorescenza ha cominciato ad aumentare. I risultati sono stati poi normalizzati in relazione ai valori di CT dello housekeeping gene, utilizzando la formula $2^{-(Ct \text{ campione} - CT \text{ housekeeping gene})}$ ($2^{-\Delta CT}$).

▪ Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati immessi in un database idoneo alla raccolta e alla loro successiva analisi.

La correlazione tra l'incidenza degli eventi avversi e la frequenza dei polimorfismi è stata calcolata mediante test del χ^2 con intervallo di confidenza del 95%. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0.05$.

Le differenze quantitative nell'espressione dei livelli di CYP1A2 mRNA nei casi e nei controlli sono state analizzate tramite il Mann–Whitney test usando la GraphPad versione 4.01 (San Diego, California, USA). Per analizzare il valore dei livelli di mRNA per la predittività delle RA è stata utilizzata la curva ROC (Receiver Operating Characteristic), calcolando l'area sotto la curva. Il cutoff del mRNA è stato calcolato usando l'indice di Youden per scegliere il cutoff

ottimale associato alla migliore specificità. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso la GraphPad versione 4.01 (San Diego, California, USA).

▪ **Criteri per la conservazione dei dati sensibili e del materiale biologico**

La conservazione dei dati clinici e del materiale biologico inerente lo studio è stata effettuata seguendo le raccomandazioni del garante per la protezione dei dati personali pubblicate sulla Gazzetta Ufficiale n. 65 del 19 marzo 2007.

RISULTATI

▪ **Analisi delle caratteristiche del campione**

Nel marzo 2008 è cominciata la fase di reclutamento, terminata nell'agosto 2009. I soggetti arruolabili in base i criteri di inclusione nello studio, che hanno accettato di partecipare al protocollo firmando il consenso informato, sono stati 34. I pazienti arruolati nello studio sono stati suddivisi in due gruppi in base alla presenza/assenza di RA clinicamente significative indotte dal trattamento con CLO, al fine di evidenziare possibili correlazioni con il genotipo dei pazienti e con l'espressività del CYP1A2 mRNA nei linfociti periferici ottenuti dal prelievo di sangue dei pazienti.

Il primo gruppo è composto da 12 pazienti che presentano RA indotte dalla clozapina, tali da determinare una sospensione della terapia (5 pazienti) o una riduzione della posologia (7 pazienti) per il sopravvenire di problematiche inerenti la gestione del trattamento o la compliance. Sono stati rilevati 19 tipi di RA, soprattutto neurologiche (11), ma anche cardiologiche (3), gastroenterologiche (2) ed ematologiche (1).

Il secondo gruppo è composto invece da 22 pazienti che durante il trattamento con clozapina non hanno manifestato alcuna RA clinicamente significativa.

Le caratteristiche dei pazienti arruolati sono riassunte nella tabella 7.

Dalla descrizione del campione reclutato emerge una sostanziale omogeneità nelle sue caratteristiche. Infatti non si rilevano differenze significative nella

distribuzione per quanto riguarda il sesso, l'età e il dosaggio medio di clozapina.

Non è stata rilevata alcuna correlazione tra abitudine al fumo di sigaretta e rischio di manifestare RA.

	n.	età (anni±DS)	genere (M/F)	fumo/ no fumo	dose di CLO (mg/die±DS)	altri farmaci (si/no)
no RA	22	40,9±9,4	14/8	17/5	395±166	8/14
RA	12	45,2±11,1	9/3	8/4	307±113	3/9
Totale	34	42,4±10,1	23/11	25/9	374±158	11/23

Tabella 7. *Descrizione del campione. n, numero di soggetti; M, maschi; F, femmine; CLO, clozapina; DS, deviazione standard.*

▪ **Identificazione dei polimorfismi *F e *C**

Per tutti i pazienti arruolati nello studio è stato possibile estrarre una quantità di DNA sufficiente per l'analisi di genotipizzazione. I risultati della genotipizzazione hanno permesso di calcolare la frequenza allelica per tutti gli SNPs studiati che sono risultati in equilibrio secondo Hardy-Weimberg, mentre le frequenze alleliche dei diversi SNPs considerati sono paragonabili a quelle presenti in letteratura (dati non mostrati).

Come mostrato in tabella 8, i risultati ottenuti hanno permesso di stabilire che, mentre non è stato possibile identificare una differenza statisticamente significativa nella frequenza allelica degli SNPs CYP1A2*1C e *1F considerati singolarmente in relazione alla comparsa di RA, è stata riscontrata una

differenza statisticamente significativa tra la presenza della combinazione allelica SM e la comparsa di RA.

Genotipo	Pazienti						P
	RA		no RA		totale		
	n	%	n	%	n	%	
CYP1A2*1C							
W	5	42	16	73	21	62	0,183
E	6	50	6	27	12	35	
C	1	8	0	0	1	3	
CYP1A2*1F							
W	5	42	3	14	8	24	0,124
E	5	42	14	64	19	56	
F	2	16	5	22	7	20	
Fenotipo							
SM	8	67	6	27	14	41	0.019
RM	4	33	16	73	20	59	

Tabella 8. Distribuzione dei genotipi e delle combinazioni alleliche e correlazione con RA.

▪ **Livelli di espressione del mRNA per il gene CYP1A2**

Per quanto riguarda i livelli di espressione del mRNA, nei linfociti periferici sono sempre presenti livelli rilevabili di CYP1A2 mRNA (media±DS=0.204±0.296). I livelli di espressione del mRNA di CYP1A2 non

sono significativamente associati ai singoli SNPs. Invece abbiamo rilevato livelli significativamente ridotti nei soggetti con combinazioni alleliche che determinano un metabolismo ridotto rispetto a quelli con combinazioni che comportano un metabolismo rapido (0.036 ± 0.033 vs. 0.311 ± 0.342 ; $p < 0.05$), come mostrato nella figura 3.

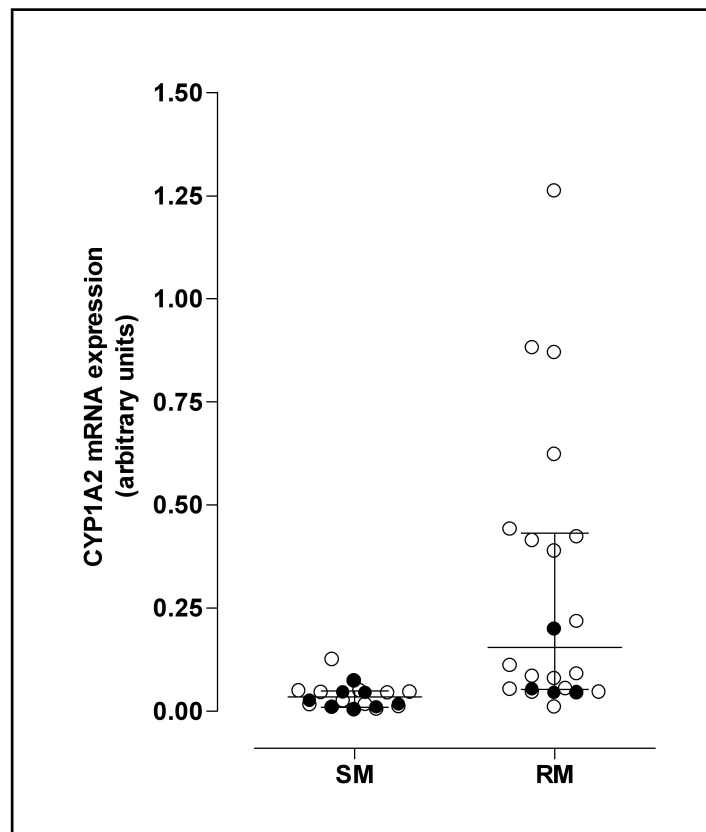


Figura 3. *Correlazione combinazioni alleliche e mRNA.*

Inoltre nei pazienti con RA i livelli di mRNA erano significativamente ridotti anche rispetto ai pazienti senza RA (0.047 ± 0.052 vs. 0.285 ± 0.346 ; $p < 0.05$), come illustrato nella figura 4.

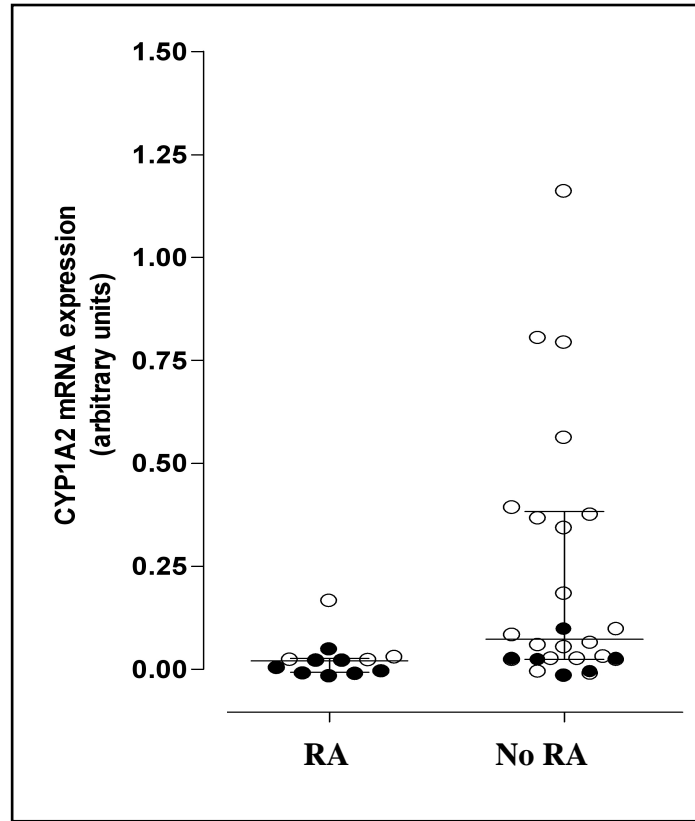


Figura 4. *Correlazione comparsa di RA e livelli di mRNA.*

Costruendo una curva della caratteristica operativa del ricevitore (ROC), cioè un grafico della sensibilità (in ordinata) e della specificità (in ascissa), misurate a diversi livelli soglia, per i livelli di espressione dell'mRNA di CYP1A2, è stato possibile determinare che, per un valore di cutoff di 0,076, la previsione della comparsa di RA, ha una sensibilità del 63% ed una specificità del 83% (figura 5).

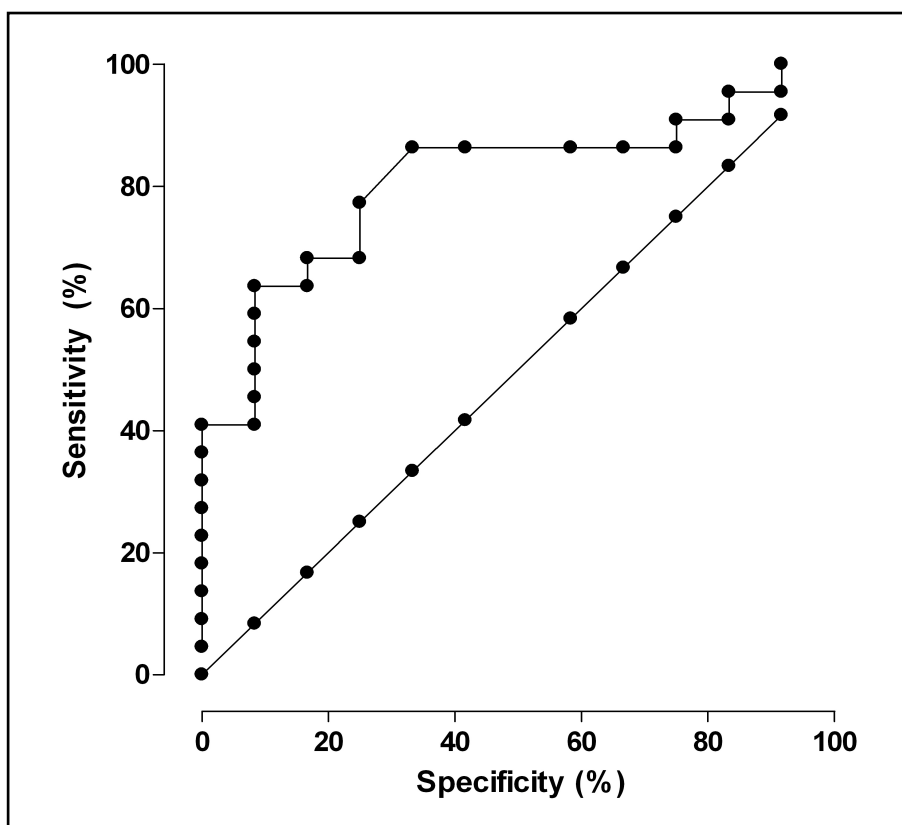


Figura 5. Curva ROC dei livelli di mRNA di CYP450 1A2 che descrive la predittività nei confronti della comparsa di RA indotti da CLO.

DISCUSSIONE

L'uso dei farmaci antipsicotici, di nuova e vecchia generazione, è caratterizzato da una notevole variabilità nell'efficacia terapeutica e nell'insorgenza di effetti collaterali. Questo, oltre a limitarne l'utilizzo, rende la scelta del farmaco difficoltosa e spesso scarsamente sostenuta da rationale scientifico. Il trattamento con antipsicotici è infatti caratterizzato da procedimenti per tentativi ed errori sino all'individuazione del farmaco più adatto e del dosaggio in grado di determinare la migliore risposta e la minore tossicità.

In campo psichiatrico è noto ormai da tempo che la risposta agli psicofarmaci varia considerevolmente da un paziente all'altro e sebbene molti elementi, tra cui l'interazione con altri farmaci, la compliance, lo stile di vita e la presenza di condizioni patologiche concomitanti, possano essere chiamati in causa per giustificare tale variabilità, gli esperti del settore sono sempre più concordi nell'affermare che i fattori genetici giochino un ruolo non indifferente in questo ambito (Wilffert et al., 2005).

Ricerche recenti hanno confermato l'importanza dei fattori genetici anche nel determinare la risposta e la sensibilità a manifestare eventi avversi alla clozapina (Kohlrausch et al., 2008). A tal proposito i risultati più interessanti e promettenti sembrano derivare dalla genotipizzazione dei polimorfismi del citocromo P450 1A2 (T.E.C., 2004; de Leon et al., 2006). È comunque necessario precisare che nessuno dei polimorfismi genetici identificati fino a questo momento è in grado di spiegare completamente l'alta variabilità interindividuale riscontrata nell'attività enzimatica del suddetto citocromo

(Welfare et al., 1994; Tantcheva-Poor et al., 1999; Nakajima et al., 1999). Infatti i risultati descritti in letteratura non sempre sembrano essere coerenti: se da una parte gli studi *in vitro* hanno ormai dimostrato la correlazione di polimorfismi come il CYP1A2 *F e *C con l'attività dell'enzima (e quindi con l'effetto metabolico), lo stesso non si può affermare per quello che riguarda i risultati degli studi clinici, dove il ruolo di polimorfismi come il CYP1A2 *F su effetti avversi tipici della clozapina come l'aumento di peso non è stato ancora confermato (Basile et al., 2001; Basile et al., 2002).

Dalla revisione della letteratura si delinea dunque un panorama piuttosto complesso e ricco di pareri contrastanti.

In ogni caso recenti risultati suggeriscono che sarebbe troppo semplicistico affermare che un singolo SNP possa spiegare la maggior parte della variabilità nella risposta ad un farmaco. L'attività di CYP1A2 è determinata da diversi SNPs; perciò non stupisce che il contributo del polimorfismo di un singolo locus nella comparsa di RA sia modesto. Pertanto la ricerca di specifiche combinazioni di polimorfismi comuni di due o più loci, aventi un possibile significato funzionale, è stata raccomandata come nuovo approccio negli studi che esaminano il background genetico delle condizioni multifattoriali che determinano la risposta ai farmaci (Kajinami et al., 2004).

Nel nostro studio abbiamo scelto di focalizzare l'attenzione sul ruolo svolto dai polimorfismi CYP1A2 *F e *C nel determinare la comparsa di RA in una popolazione di pazienti schizofrenici in trattamento con clozapina. Infatti questi due polimorfismi hanno suscitato maggior interesse nei ricercatori in quanto possiedono una frequenza allelica superiore all'1% nei soggetti Caucasici ed è

stato possibile dimostrare che si associano con sensibili modificazioni nell'inducibilità dell'espressione del gene del citocromo in questione (Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 1999; Han et al., 2000; Han et al., 2001; Hamdy et al., 2003; Sachse et al., 2003).

L'aspetto innovativo di questo studio consiste principalmente nel considerare, non solo l'associazione tra singoli SNPs, ma anche la presenza/assenza della combinazione delle due forme alleliche. I risultati del nostro studio sembrano suggerire che questo tipo di approccio possa essere più utile nella previsione, basata sul genotipo, della risposta al trattamento con CLO.

Infatti, per quanto riguarda l'associazione tra il genotipo e la comparsa di RA, i dati ottenuti mostrano come la frequenza allelica di *F e *C non risulti modificata in modo significativo in relazione alla comparsa di eventi avversi. Se tuttavia si prendono in esame non i singoli polimorfismi, ma l'aplotipo ottenuto dalla combinazione degli alleli associati a ridotto metabolismo è possibile notare come nei pazienti colpiti da RA, si abbia un aumento statisticamente significativo della frequenza del fenotipo SM. Quindi il fenotipo che abbiamo definito SM (caratterizzato cioè dalla presenza del polimorfismo *C e/o dall'assenza di *F), si potrebbe correlare con una più bassa attività enzimatica e di conseguenza con un aumento del rischio di RA.

Inoltre abbiamo mostrato una correlazione tra livelli di CYP1A2 mRNA sia con le combinazioni di SNPs sia con la presenza di RA. Dal momento che gli SNPs si trovano nella regione del promotore è possibile affermare che la relazione tra SNPs e RA sia spiegabile con una riduzione dell'attività trascrizionale e quindi dei livelli di mRNA e dell'attività enzimatica.

I nostri risultati ci permettono di ipotizzare l'utilizzo di combinazioni alleliche di SNPs del CYP1A2 in associazione con i livelli di espressione di mRNA come predittori di comparsa di eventi avversi e in ultima analisi di esito del trattamento con CLO, aiutando i clinici nell'identificare la migliore strategia di dosaggio per ogni paziente, permettendo di individuare quali soggetti presentino un maggiore rischio di reazione avversa.

Il trattamento con clozapina potrebbe essere più rischioso nei pazienti con fenotipo SM per il CYP1A2 e risultare meno efficace nei pazienti RM. Questi ultimi inoltre, essendo portatori di una variante del CYP1A2 ad alta attività enzimatica, potrebbero sviluppare RA clinicamente rilevanti con minore frequenza.

D'altra parte è probabile che, per approfondire ulteriormente la relazione tra combinazioni alleliche e risposta alla clozapina, si renderà necessario studiare non solo i polimorfismi nei geni responsabili del metabolismo del farmaco, ma anche quelli in tutte le altre proteine (enzimi metabolizzatori, proteine trasportatrici, recettori della dopamina e della serotonina, ecc.) che possono in qualunque misura influenzarne la biodisponibilità (Sheng-nan et al., 2006; Wilffert et al., 2005). A questo proposito la valutazione della concentrazione plasmatica del farmaco resta un parametro di fondamentale importanza per evitare errori nell'attribuzione delle cause di variabilità.

Recentemente per predire la risposta a clozapina la ricerca si è indirizzata verso lo studio di polimorfismi di geni che codificano per diversi target: proteine implicate nella connessione sinaptica, come la neurexina (Souza et al., 2010a), il recettore della serotonina HTR3A (Souza et al., 2010b), il recettore per il

fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali -GDNF- (Souza et al., 2010c), il recettore D3 della dopamina (Hwang et al., 2010), il trasportatore della dopamina (Xu et al., 2010) e della serotonina (Kohlrausch et al., 2010), la proteina trasportatrice transmembrana ABCB1 (Consoli et al., 2009).

Un altro aspetto che è stato preso in considerazione in questo studio riguarda la possibilità che in soggetti fumatori le RA si manifestino con minor frequenza rispetto ai non fumatori in seguito all'assunzione di clozapina, soprattutto tenendo conto che l'abitudine al fumo di sigaretta è più frequente nei pazienti schizofrenici rispetto alla popolazione generale (Sagud et al., 2009). Infatti, come riportato in letteratura, il fumo di sigaretta si comporta da induttore del CYP1A2 (Zevin e Benowitz, 1999; Carrillo et al., 2003; de Leon, 2004), implementando i processi metabolici necessari all'eliminazione della clozapina: potrebbe risultare dunque un "fattore protettivo" rispetto alla possibilità di sviluppare RA durante il trattamento con questo farmaco. In letteratura infatti è riportato un aumento dei livelli di clozapinemia in seguito a brusca sospensione dell'abitudine al fumo, con aumento del rischio di tossicità da clozapina (Cormac et al., 2010).

Nel nostro campione comunque, non è emersa una differenza statisticamente significativa tra i fumatori e i non fumatori in relazione alla possibilità di manifestare RA.

V. CONCLUSIONI

L'introduzione in commercio della clozapina ha rappresentato una rivoluzione nell'ambito dei trattamenti psicofarmacologici, in quanto questa sostanza presenta un profilo di efficacia unico anche nelle forme di schizofrenia risultate resistenti all'approccio con altri antipsicotici e i benefici ottenibili superano i rischi associati al trattamento. Attualmente clozapina è stata definita "l'unico trattamento evidence-based" per la schizofrenia resistente (Kane & Correll, 2010). La percentuale di risposta in pazienti che si sono mostrati resistenti agli antipsicotici tradizionali si può stimare tra il 30 e il 60% (Kane, 1992; Özdemir et al., 2001). In una recente review commissionata dalla Cochrane Library (Asenjo Lobos et al., 2010), appare evidente come clozapina, sebbene sia necessario valutare attentamente i pazienti prima di iniziare il trattamento per il profilo di tollerabilità non elevato, sia risultata più efficace di altri antipsicotici di nuova generazione, soprattutto circa la riduzione del rischio di suicidio e di ricoveri, come già rilevato in altri studi (Nyakyoma & Morriss, 2010).

L'utilizzo della clozapina in ambito clinico si configura dunque come un'opportunità terapeutica importante da non riservare necessariamente a condizioni cliniche estreme, ma da considerare alla luce di tutte le sue valenze positive. Recentemente, sulla base delle evidenze di buona tollerabilità e ridotti tassi di mortalità rispetto ad altri antipsicotici (Tiihonen et al., 2009), è stata ipotizzata addirittura una rivalutazione delle linee guida di trattamento della schizofrenia, che relegano l'utilizzo di clozapina solo nei casi di resistenza o inefficacia delle altre terapie (Agid et al., 2010). Tuttavia, l'uso di clozapina rappresenta sempre un fattore di rischio di morte improvvisa per i pazienti psichiatrici (Windfuhr et al., 2010).

Peraltro l'uso della clozapina può essere migliorato e ottimizzato dalla conoscenza dei fattori in grado di determinare le differenze interindividuali nella risposta al farmaco. Infatti, come riportato in letteratura, il 40-70% dei pazienti trattati non risponde nemmeno alla clozapina: in molti di questi casi è tuttavia possibile supporre che la natura della resistenza sia di origine metabolica e possa dunque dipendere, almeno in parte, dalla “costituzione genetica” di ciascun individuo (Papetti, 2007).

I miglioramenti ottenuti nel corso degli ultimi anni nelle tecniche di biologia molecolare potrebbero permettere, in futuro, di descrivere il “profilo metabolico” di un paziente sulla base della sua “costituzione genetica” e quindi di predire il tipo di risposta soggettiva alla somministrazione di un farmaco.

Nel caso della clozapina, per esempio, se fosse possibile inquadrare lo stato metabolico di un paziente prima della sua somministrazione, questo permetterebbe di ottimizzare il trattamento con i seguenti vantaggi:

- “personalizzare” la terapia psicofarmacologica, identificando il dosaggio più efficace per ciascun soggetto;
- abbattere il rischio di effetti collaterali e reazioni avverse, sia per quanto riguarda la loro frequenza, sia la loro intensità;
- migliorare la compliance.

A tal proposito è stato stimato che la determinazione del profilo genetico può comportare una riduzione della comparsa di reazioni avverse del 10-20% e aumentare l'efficacia della terapia del 10-15%. Quest'ultimo dato è stato posto in relazione anche con la probabilità che aumenti l'aderenza al trattamento (Ingelman-Sundberg, 2004).

L'allestimento di specifici test genetici in grado di coadiuvare la scelta del dosaggio di clozapina più adatto per ogni paziente e di identificare quei soggetti a rischio di sviluppare reazioni avverse potrebbe portare a una riduzione generale del rischio associato a tale terapia. Ciò determinerebbe benefici almeno su due fronti:

- per il paziente, con un miglioramento dell'outcome e della qualità di vita;
- per i costi di gestione della terapia, con una riduzione degli stessi: basti pensare alla maggiore assistenza che deve essere erogata, sia in ambito ospedaliero che territoriale, nei casi in cui la terapia non abbia successo o per il sopravvenire di eventi avversi e disturbanti effetti collaterali.

Va precisato comunque che l'ottenimento di una reale personalizzazione della terapia è subordinato a una valutazione più complessiva che deve prendere in considerazione molti altri fattori che sono fondamentali nel determinare la risposta a un trattamento farmacologico e che possono riguardare il paziente (grado di malattia, abitudini di vita, compliance, ecc) o gli aspetti farmacodinamici e farmacocinetici (funzionalità epatica e renale, polifarmacoterapia).

In ogni caso, i risultati dello studio riportato in questa tesi costituiscono un primo passo verso la conferma di una relazione tra polimorfismi/combinazioni alleliche del CYP1A2 ed eventi avversi alla clozapina e quindi si possono inscrivere nel panorama delle ricerche volte a valorizzare e approfondire la rilevanza degli aspetti genetici nella risposta clinica agli antipsicotici.

VI. APPENDICE

LIVERPOOL UNIVERSITY NEUROLEPTIC SIDE-EFFECT RATING
SCALE (LUNSERS)

	Assente	Poco	Abbastanza	Molto	Moltissimo
1. Eritema					
2. Difficoltà a stare sveglio di giorno					
3. Naso che cola					
4. Aumento dei sogni					
5. Mal di testa					
6. Bocca secca					
7. Gonfiore al petto					
8. Geloni					
9. Difficoltà a concentrarsi					
10. Stitichezza					
11. Perdita dei capelli					
12. Urine più scure del solito					
13. Irregolarità del ciclo					
14. Tensione					
15. Vertigini					
16. Nausea					
17. Aumento del desiderio sessuale					
18. Stanchezza					
19. Rigidità muscolare					
20. Palpitazioni					
21. Difficoltà a ricordare le cose					
22. Perdita di peso					
23. Mancanza di emozioni					
24. Difficoltà a raggiungere l'orgasmo					
25. Fragilità delle unghie					
26. Depressione					
27. Aumento della sudorazione					
28. Ulcere in bocca					

29. Lentezza nei movimenti					
30. Pelle grassa					
31. Sonnolenza					
32. Difficoltà a urinare					
33. Vampate al volto					
34. Spasmi muscolari					
35. Sensibilità al sole					
36. Diarrea					
37. Aumento della salivazione					
38. Visione offuscata					
39. Aumento di peso					
40. Irrequietezza					
41. Difficoltà ad addormentarsi					
42. Dolore ai muscoli del collo					
43. Tremori					
44. Formicolii					
45. Dolori articolari					
46. Diminuzione del desiderio sessuale					
47. Macchie nuove o insolite sulla pelle					
48. Movimenti involontari del corpo					
49. Prurito					
50. Mestruazioni meno frequenti					
51. Aumento della quantità di urina					

VII. BIBLIOGRAFIA

- ACKENHEIL VM, BRAU H, BURKHART A, FRANKE A, PACHA W: *Antipsychotic efficacy in relation to plasma levels of clozapine*. *Arzneimittelforschung*, 1976; 26: 1156-1158 (German; English abstract).
- AGID O, FOUSSIAS G, SINGH S, REMINGTON G: *Where to position clozapine: re-examining the evidence*. *Can J Psychiatry*. 2010 Oct; 55(10): 677-84.
- AITCHISON KJ, JANN MW, ZHAO JH, SAKAI T, ZAHER BH, WOLFF K, COLLIER DA, KERWIN RW, GONZALEZ FJ: *Clozapine pharmacokinetics and pharmacodynamics studied with CYP1A2-null mice*. *J Psychopharmacol*. 2000; 14(4): 353-9.
- AITCHISON KJ, GILL M: *Pharmacogenetics in the postgenomic era*. In *Behavioral Genetics in the Postgenomics Era*. Edited by Plomin R, Defries JC, Craig IW, McGuffin P. Washington DC: American Psychological Association; 2003: 335-361.
- ALVIR JMJ, LIEBERMAN JA, SAFFERMAN AZ, et al: *Clozapine-induced agranulocytosis: incidence and risk factors in the United States*. *N Engl J Med*, 1993; 329: 162-167.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: *DSM-IV-TR, Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali – Text Revision*. Masson, 2002.
- AMES D, CARTER J, WIRSHING WC, et al: *Clozapine associated eosinophilia and neutropenia*. *Schizophr Res*, 1995; 15: 12.
- AMSLER HA, TEERENHOVI L, BARTH E, et al: *Agranulocytosis in patients treated with clozapine: a study of the Finnish epidemic*. *Acta Psychiatr Scand*, 1977; 56: 241-248.
- ANDERSON ES, POWERS PS: *Neuroleptic malignant syndrome associated with clozapine use*. *J Clin Psychiatry*, 1991; 52: 102-104.
- ANGST J, BENTE D, BERNER P, et al (1971), in CASSANO GB et al, *Guida all'impiego della clozapina nella pratica psichiatrica*. Il Pensiero Scientifico Editore, 1996.
- ARRANZ MJ, DE LEON J: *Pharmacogenetic and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research*. *Molecular Psychiatry*, 2007; 12: 707-747.
- ASENJO LOBOS C, KOMOSSA K, RUMMEL-KLUGE C, HUNGER H, SCHMID F, SCHWARZ S, LEUCHT S: *Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia*. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Nov 10; 11:CD006633.

ATHANASIOU MC, DETTLING M, CASCORBI I, MOSYAGIN I, SALISBURY BA, PIERZ KA, et al.: *Candidate gene analysis identifies a polymorphism in HLA-DQB1 associated with clozapine-induced agranulocytosis*. J Clin Psychiatry. 2010 Sep 21. [Epub ahead of print]

AVENOSO A, FACCIOLÀ G, SCORDO MG, et al: *No effect of citalopram on plasma concentration of clozapine, risperidone and their active metabolites in patients with chronic schizophrenia*. Clin Drug Invest, 1998; 16: 393-398.

BALDESSARINI RJ, FRANKENBURG FR: *Clozapine*. N Engl J Med, 1991; 324: 746-754.

BANOV MD, TOHEN M, FRIEDBERG J: *High risk of eosinophilia in women treated with clozapine*. J Clin Psychiatry, 1993; 54: 466-469.

BARBINI B, SCHERILLO P, SMERALDI E, et al: *Response to clozapine in acute mania is more rapid than of chlorpromazine*. Int Clin Psychopharmacol, 1997; 12(2): 109-112.

BASILE VS, MASELLIS M, McINTYRE RS, MELTZER HY, LIEBERMAN JA, KENNEDY JL: *Genetic dissection of atypical antipsychotic induced weight gain: novel preliminary data on the pharmacogenetic puzzle*. J Clin Psychiatry, 2001; 62 (Suppl. 23): 45-66.

BASILE VS, MASELLIS M, POTKIN SG, KENNEDY JL: *Pharmacogenomics in schizophrenia: the quest for individualized therapy*. Hum Mol Genet, 2002 Oct 1, 11(20): 2517-30.

BELL R, McLAREN A, GALANOS J, COPOLOV D: *The clinical use of plasma clozapine levels*. Australian and New Zealand Journal of Psychiatry, 1998; 32: 567-574.

BENEDETTI F, SFORZIONI L, COLOMBO C, MAFFEI C, SMERALDI E: *Low-dose clozapine in acute and continuation treatment of severe borderline personality disorder*. J Clin Psych, 1998; 59(3): 103-7.

BERMAN I, ZALMA A, DuRAND CJ, GREEN AI: *Clozapine-induced myoclonic jerks and drop attacks*. J Clin Psychiatry, 1992; 53: 300-329.

BERTILSSON L, CARRILLO JA, DAHL ML, et al: *Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test*. Br J Clin Pharmacol, 1994; 38: 471-473.

BESAG FMC, BERRY D: *Interactions between antiepileptic and antipsychotic drugs*. Drug Saf, 2006; 29: 95-118.

- BHIDAYASIRI R, BOONYAWAIROJ S: *Spectrum of tardive syndromes: clinical recognition and management*. Postgrad Med J. 2010 Dec 3. [Epub ahead of print]
- BOLOGA M, TANG B, KLEIN J, TESORO A, KOREN G: *Pregnancy-induced changes in drug metabolism in epileptic women*. J Pharmacol Exp Ther, 1991; 257(2): 735-40.
- BORBA C, HENDERSON D: *Citalopram and clozapine: potential drug interaction*. J Clin Psychiatry, 2000; 61: 301-302.
- BORISON RL, DIAMOND BI, SINHA D, et al: *Clozapine withdrawal rebound psychosis*. Psychopharmacol Bull, 1988; 24: 260-263.
- BRAU VH, BURKHART A, PACHA W, ACKENHEIL VM: *Relationships between effects and plasma levels of clozapine*. Arzneimittelforschung, 1978; 28: 1300 (German; English abstract).
- BRENNER HD, DENCKER SJ, GOLDSTEIN MJ, et al: *Defining treatment refractoriness in schizophrenia*. Schizophr Bull, 1990; 16(4): 551-561.
- BROSEN K, SKIELBO E, RASMUSSEN BB, et al: *Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2*. Biochem Pharmacol, 1993; 45: 1211-1214.
- BROWN TM, STOUDEMIRE A: *Effetti collaterali neuropsichiatrici dei farmaci*, Centro Scientifico Ed., 1999.
- BUCHANAN RW, BREIER A, KIRKPATRICK B, et al: *Positive and negative symptom response to clozapine in schizophrenic patients with and without the deficits syndrome*. Am J Psych, 1998; 155: 751-760.
- BYERLY MJ, DE VANE CL: *Pharmacokinetics of clozapine and risperidone: a review of recent literature*. J Clin Psychopharmacol, 1996; 16(2): 177-87.
- CARRILLO JA, JERLING M, BERTILSSON L: *Comments to "interaction between caffeine and clozapine"*. J Clin Psychopharmacol, 1995; 15: 376-377.
- CARRILLO JA, HERRAIZ AG, RAMOS SI, GERVA SINI G, VIZCAINO S, BENITEZ J: *Role of smoking-induced cytochrome P450 (CYP) 1A2 and polymorphic CYP2D6 in steady-state concentration of olanzapine*. J Clin Psychopharmacol, 2003; 23: 119-27.
- CASEY DE: *Clozapine: neuroleptic-induced EPS and tardive dyskinesia*. Psychopharmacology, 1989; (Berl) 99 (suppl): S47-S53.

- CASLEY WL, LEBLANC-WESTWOOD CA: *Assay for the simultaneous detection of the *1C and *1F alleles of the CYP1A2 gene by real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis*. *Psychiatr Genet*, 2006; 16(2): 81-3.
- CASSANO GB, LAMBERTENGI DELILIERI G, PANCHERI P, RACAGNI G: *Guida all'impiego della clozapina nella pratica psichiatrica. Tollerabilità e interazioni*. Il Pensiero Scientifico Editore, 1996.
- CENTORRINO F, BALDESSARINI RJ, KANDO J, FRANKENBURG FR, VOLPICELLI SA, FLOOD JG: *Serum concentrations of clozapine and its metabolites: effects of cotreatment with fluoxetine or valproate*. *Am J Psychiatry*, 1994; 151: 123-5.
- CENTORRINO F, BALDESSARINI RJ, FRANKENBURG FR, KANDO J, VOLPICELLI SA, FLOOD JG: *Serum levels of clozapine and norclozapine in patients treated with selective serotonin reuptake inhibitors*. *Am J Psychiatry*, 1996; 153: 820-3.
- CHANG WH, et al: *Clozapine dosages and plasma drug concentrations*. *J. Formos. Med. Assoc.*, 1997; 96: 599-605.
- CHENG YF, LUNDBERG T, BONDESSON U, LINDSTRÖM L, GABRIELSSON J: *Clinical pharmacokinetics of clozapine in chronic schizophrenic patients*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1988; 34 (5): 445-9.
- CHOC MG, HSUAN F, HONIGFELD G, et al: *Single - vs multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in psychiatric patients*. *Pharm Res*, 1990; 7(4): 347-51.
- CHONG SA, TAN CH, LEE HS: *Worsening of psychosis with clozapine and selective serotonin reuptake inhibitor combination: two case reports*. *J Clin Psychopharmacol*, 1997; 17: 68-69.
- CIAPPARELLI A, DELL'ORSO L, CASSANO GB, et al: *Clozapine for treatment-refractory schizophrenia, schizoaffective disorder, and psychotic bipolar disorder: a 24-month naturalistic study*. *J Clin Psych*, 2000; 61: 329-334.
- CITROME L, BILDER RM, VOLAVKA J: *Managing treatment-resistant schizophrenia: evidence from randomised clinical trials*. *J Psychiatr Pract*, 2002; 8(4): 205-15.
- COHEN S, CHILES J, McNAUGHTON A: *Weight gain associated with clozapine*. *Am J Psychiatry*, 1990; 147: 503-504.

COHEN LG, CHESLEY S, EUGENIO L, et al: *Erythromycin-induced clozapine toxic reaction*. Arch Intern Med, 1996; 156: 675-677.

CONSOLI G, LASTELLA M, CIAPPARELLI A, et al.: *ABCBI polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients*. Pharmacogenomics. 2009 Aug; 10(8): 1267-76.

CORMAC I, BROWN A, CREASEY S, FERRITER M, HUCKSTEP B: *A retrospective evaluation of the impact of total smoking cessation on psychiatric inpatients taking clozapine*. Acta Psychiatr Scand. 2010 May; 121(5): 393-7. Epub 2009 Oct 13.

CREWE HK, LENNARD MS, TUCKER GT, et al: *The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes*. Br J Clin Pharmacol., 1992; 34: 262-265.

CROISSANT B, HERMANN D, OLBRICH R: *Reduction of side effects by combining clozapine with amisulpride: case report and short review of clozapine-induced hypersalivation - a case report*. Pharmacopsychiatry, 2005; 38(1): 38-9.

DAHL ML: *Cytochrome P450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing?*. Clin Pharmacokinet, 2002; 41(7): 453-70.

DALY AK, CHOLERTON S, GREGORY W, IDLE JR: *Metabolic polymorphisms*. Pharmacol Ther, 1993; 57(2-3): 129-60.

DAS GUPTA K, YOUNG A: *Clozapine-induced neuroleptic malignant syndrome*. J Clin Psychiatry, 1991; 52: 105-107.

DAY JC, GRAHAM W, DEWEY MIKE, BENTALL RP: *A Self Rating Scale for Measuring Neuroleptic Side-Effects. Validation in a group of schizophrenic patients*. British Journal of Psychiatry, 1995; 166: 650-653.

DE LEON J, STANILLA JK, WHITE AO, et al: *Anticholinergics to treat clozapine withdrawal*. J Clin Psychiatry, 1994; 55: 119-120.

DE LEON J: *Atypical antipsychotic dosing: the effect of smoking and caffeine*. Psychiatr Serv, 2004; 55: 491-3.

DE LEON J, et al: *Clinical Guidelines for Psychiatrists for the use of Pharmacogenetics Testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19*. Psychosomatics, 2006; 47: 75-85.

DE LEON J, et al: *Weight gain during a double-blind multidosage clozapine study*. J. Clin. Psychopharmacol., 2007; 27: 22-7.

- DEQUADRO JM, ROBERTS M: *Elevated clozapine levels after fluvoxamine inhibition*. Am J Psychiatry, 1996; 153: 840-841.
- DEVINSKY O, HONIGFELD G, PATIN J: *Clozapine-related seizures*. Neurology, 1991; 41: 369-371.
- DREYFUSS P, VOGEL D, WALSH N: *The use of transdermal scopolamine to control drooling. A case report*. Am J Phys Med Rehabil, 1991; 70(4): 220-2.
- DUMORTIER G, LOCHU A, COLEN DE MELO P, et al: *Elevated clozapine plasma concentration after fluvoxamine initiation*. Am J Psychiatry, 1996; 153: 738-789.
- EAP CHIN B, BENDER S, JAQUENOUD SE, CUCCHIAG, JONZIER-PEREY M, BAUMANN P, et al: *Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene*. J Clin Psychopharmacol, 2004; 24(2): 214-9.
- EICHELBAUM M, INGELMAN-SUNDBERG M, EVANS WE: *Pharmacogenomics and individualized drug therapy*. Annu. Rev. Med., 2006; 57, 119-37.
- EIERMAN B, ENGEL G, JOHANSSON I, et al: *The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine*. Br J Clin Pharmacol, 1997; 44: 439-446.
- ELOMAA E: *The secret of clozapine: to sleep while awake?*. Med Hypoth, 1994; 43: 245-246.
- EVANS WE, RELLING MV: *Pharmacogenomics: translating functional genomics in rational therapeutics*. Science, 1999; 286: 487-91.
- EVANS WE, JOHNSON JA: *Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2001; 2: 9-39.
- FABER MS, FUHR U: *Time response of CYP1A2 activity on cessation of heavy smoking*. Clin Pharmacol Therap, 2004; 76: 178-184.
- FABER MS, JETTER A, FUHR U: *Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when?*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2005; 97: 125-134.
- FABRAZZO M, LA PIA S, MONTELEONE P, et al: *Fluvoxamine increases plasma and urinary levels of clozapine and its major metabolites in a time- and dose-dependent manner*. J Clin Psychopharmacol, 2000; 20: 708-710.

FACCIOLÁ G, AVENOSO A, SPINA E, et al: *Inducing effect of phenobarbital on clozapine metabolism in patients with chronic schizophrenia*. Ther Drug Monit, 1998; 20: 89-93.

FITTON A, HEEL RC: *Focus on clozapine*. Drugs, 1990; 40: 722-747.

FOUSSIAS G, REMINGTON G. *Antipsychotics and schizophrenia: from efficacy and effectiveness to clinical decision-making*. Can J Psychiatry. 2010 Mar; 55(3): 117-25.

FREEMAN DJ, OYEWUMI LK: *Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy?* Clin Pharmacokinet, 1997; 32: 93-100.

FRICK A, KOPITZ J, BERGEMANN N: *Omeprazole reduces clozapine plasma concentrations. A case report*. Pharmacopsychiatry, 2003; 36: 121-123.

FRYE MA, KETTER TA, ALTSHULER LL, et al: *Clozapine in bipolar disorder: treatment implications for other atypical antipsychotics*. J Affect Disord, 1998; 48: 91-104.

FUHR U, ANDERS EM, MAHR G, et al: *Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P4501A2 in vivo and in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36: 942-948.

FUHR U, ROST KL: *Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva*. Pharmacogenetics, 1994; 4(3): 109-16.

FUNDERBURG LG, VERTRESS JE, TRUE JE, et al: *Seizure following addition of erythromycin to clozapine treatment*. Am J Psychiatry, 1994; 151: 1840-1841.

GABBAY O'DOWD MA, MAMAMTAVRISHVILI M, ASNIS GM: *Clozapine and oral contraceptives: a possible drug interaction*. J Clin Psychopharmacol, 2002; 22: 621-2.

GEIBIG CB, MARKS LW: *Treatment of clozapine - and molindone - induced agranulocytosis with granulocyte colony-stimulating factor*. Ann Pharmacother, 1993; 27: 1190-1192.

GERSON SL, LIEBERMAN JA, FRIEDENBERG WR, LEE D, MARKX JJ JR, MELTZER H: *Polypharmacy in fatal clozapine-associated agranulocytosis*. Lancet, 1991; 338: 262-263.

GERSON SL, MELTZER H: *Mechanisms of clozapine-induced agranulocytosis*. Drug Safety, 1992; 7 (suppl. 1): 17-25.

GOLDMAN MB: *The assessment and treatment of water imbalance in patients with psychosis*. Clin Schizophr Relat Psychoses. 2010 Jul; 4(2): 115-23.

GREEN AI, TOHEN M, PATEL JK, et al: *Clozapine in the treatment of refractory psychotic mania*. Am J Psych, 2000; 157: 982-986.

GREENBLATT DJ, VON MOLTKE LL, SCHMIDER J, HARMATZ JS, SHADER RI: *Inhibition of human cytochrome P450-3A isoforms by fluoxetine and norfluoxetine in vitro and in vivo studies*. J Clin Pharmacol, 1996; 36: 792-8.

GUDELSKY GA, NASH JF, KOENIG JI, et al: *Neuroendocrine effects of typical and atypical antipsychotics in the rat*. Psychopharmacol Bull, 1987; 23: 483-486.

HAGG S, SPIGSET O, MJORNDAL T, et al: *Absence of interaction between erythromycin and a single dose of clozapine*. Eur J Clin Pharmacol, 1999; 55: 221-226.

HAGG S, SPIGSET O, MJORNDAL T, et al: *Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 2000; 49: 59-63.

HAHN MK, REMINGTON G, BOIS D, COHN T: *Topiramate augmentation in clozapine-treated patients with schizophrenia: clinical and metabolic effects*. J Clin Psychopharmacol. 2010 Dec; 30(6): 706-10.

HALPER JR: *Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995; 35: 29-53 (Complementary properties of isoform-selective P450 inhibitors and their target enzymes determine inhibitors selectivity).

HAMDY SI, HIRATSUKA M, NARAHARA K, ENDO N, EL-ENANY M, MOURSI N, AHMED MS, MIZUGAKI M: *Genotyping of four genetic polymorphisms in the CYP1A2 gene in the Egyptian population*. Br J Clin Pharmacol, 2003; 55(3): 321-4.

HAN XM, CHEN XP, WU QN, JIANG CH, ZHOU HH: *G-2964A and C-734A genetic polymorphisms of CYP1A2 in Chinese population*. Acta Pharmacol Sin, 2000; 21: 1031-1034.

HAN XM, OU-YANG DS, LU PX, JIANG CH, SHU Y, CHENG XP, TAN ZR, ZHOU HH: *Plasma caffeine metabolite ratio (17X /137X) in vivo associated with G-2964A and C-734A polymorphisms of human CYP1A2*. Pharmacogenetics, 2001; 11: 429-435.

- HASEGAWA M, GUTIERREZ-ESTEINOU R, WAY L, MELTZER HY: *Relationship between clinical efficacy and clozapine concentrations in plasma in schizophrenia: effect of smoking*. J Clin Psychopharmacol, 1993; 13: 383-390.
- HIEMKE C, WEIGHMANN H, HARTTER S, et al: *Elevated serum levels of clozapine after addition of fluvoxamine*. J Clin Psychopharmacol, 1994; 14: 279-281.
- HIPPIUS H: *The history of clozapine*. Psychopharmacol, 1989; 99: 53-55.
- HONIGFELD G: *Effects of the clozapine national registry system on incidence of deaths related to agranulocytosis*. Psychiatr Serv, 1996; 47: 52-56.
- HOWANITZ E, PARDO M, SMELSON DA, et al: *The efficacy and safety of clozapine versus chlorpromazine in geriatric schizophrenia*. J Clin Psych, 1999; 60(1): 41-44.
- HUMMER M, KEMMLER G, KURZ M, KURZTHALER I, OBERBAUER H, FLEISCHHACKER WW: *Weight gain induced by clozapine*. Eur Neropsychopharmacol, 1995; 5(4): 437-40.
- HWANG R, et al: *Association study of 12 polymorphisms spanning the dopamine D(2) receptor gene and clozapine treatment response in two treatment refractory/intolerant populations*. Psychopharmacology, 2005; 181: 179-87.
- HWANG R, et al: *Effect of dopamine D3 receptor gene polymorphisms and clozapine treatment response: exploratory analysis of nine polymorphisms and meta-analysis of the Ser9Gly variant*. Pharmacogenomics J. 2010 Jun; 10(3): 200-18. Epub 2009 Dec 22.
- INGELMAN-SUNDBERG M: *Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future*. Trends Pharmacol Sci, 2004; 25: 193-200.
- INGELMAN-SUNDBERG M, SIM SC, GOMEZ A, RODRIGUEZ-ANTONA C: *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects*. Pharmacol Ther. 2007 Dec; 116(3): 496-526. Epub 2007 Oct 9.
- JAISWAL AK, NEBERT DW, McBRIDE OW, GONZALEZ FJ: *Human P3450: cDNA and complete protein sequence, repetitive alu sequences in the 3' nontranslated region, and localization of gene to chromosome 15*. J. Exp. Pathol., 1987; 3, 1-17.

-
- JANN MW, GRIMSTEY SR, GRAY EC, et al: *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine*. Clin Pharmacokinet, 1993; 24: 161-176.
- JERLING M, LINDSTROM L, BONDESSON, et al: *Fluvoxamine inhibition and carbamazepine induction of the metabolism of clozapine: evidence from a therapeutic drug monitoring service*. Ther Drug Monit, 1994; 16: 368-374.
- JOOPER R, BOKSA P: *Clozapine: a distinct, poorly understood and under-used molecule*. J Psychiatry Neurosci. 2010 May; 35(3): 147-9.
- JOOS AAB, FRANK UG, KASCHKA WP: *Pharmacokinetic interaction of clozapine and rifampicin in a forensic patient with an atypical mycobacterial infection*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 83-85.
- JUNGHAN U, ALBERS M, WOGGON B: *Increased risk of hematological side-effect in psychiatric patients treated with clozapine and carbamazepine*. Pharmacopsychiatry, 1993; 26: 262.
- KAJINAMI K, TAKEKOSHI N, BROUSSEAU ME, SCHAEFER EJ: *Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management*. Atherosclerosis. 2004 Dec; 177(2): 219-34.
- KALOW W, TANG BK: *Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities*. Clin Pharmacol Ther, 1991; 50(5 Pt 1): 508-19.
- KALOW W, TANG BK, ENDRENYI L: *Hypothesis: comparison of inter- and intra- individual variations can substitute for twin studies in drug research*. Pharmacogenetics, 1998; 8: 283-9.
- KANE JM, COOPER TB, SACHER EJ, et al: *Clozapine: plasma levels and prolaction response*. Psychopharmacology, 1981; 73: 184-187.
- KANE JM: *Clinical efficacy of clozapine in treatment-refractory schizophrenia: an overview*. Br J Psychiatry, 1992; 17(suppl): 41-45.
- KANE JM: *Schizophrenia*. N Engl J Med, 1996; 334: 34-41.
- KANE JM, CORRELL CU: *Pharmacologic treatment of schizophrenia*. Dialogues Clin Neurosci. 2010; 12(3): 345-57.
- KANEDA Y, JAYATHILAK K, MELTZER H: *Determinants of work outcome in neuroleptic-resistant schizophrenia and schizoaffective disorder: cognitive impairment and clozapine treatment*. Psychiatry Res. 2010 Jun 30; 178(1): 57-62. Epub 2010 May 8.

KAO SL, CHONG SS, LEE CG: *The role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in understanding complex disorders and pharmacogenomics*. Ann Acad Med Singapore, 2000; 29(3): 376-82.

KELLY DK, et al: *Clozapine utilization and outcomes by race in a public mental health system: 1994-2000*. J. Clin. Psychiatry, 2006; 67: 1404-11.

KERWIN RW: *Adverse reactions reporting and new antipsychotics*. Lancet, 1993; 342: 1440.

KESSING LV, THOMSEN AF, MOGENSEN UB, ANDERSEN PK. *Treatment with antipsychotics and the risk of diabetes in clinical practice*. Br J Psychiatry. 2010 Oct; 197(4): 266-71.

KHAN AY, PRESKORN SH: *Examining concentration-dependence toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring*. J Psychiatr Pract, 2005; 11: 289-301.

KLIMKE A, KLIESER E: *Sudden death after intravenous application of lorazepam in a patient treated with clozapine*. Am J Psychiatry, 1994; 151: 780.

KOHLRAUSCH FB, et al: *G-protein gene 825C>T polymorphism is associated with response to clozapine in Brazilian schizophrenics*. Pharmacogenomics, 2008; 9 (10): 1429-36.

KOHLRAUSCH FB, SALATINO-OLIVEIRA A, GAMA CS, LOBATO MI, BELMONTE-DE-ABREU P, HUTZ MH: *Influence of serotonin transporter gene polymorphisms on clozapine response in Brazilian schizophrenics*. J Psychiatr Res. 2010 Dec; 44(16): 1158-62. Epub 2010 May 10.

KOPONEN HJ, LEINONEN E, LEPOLA U: *Fluvoxamine increases the clozapine serum levels significantly*. Eur Neuropsychopharmacol, 1996; 6(1): 69-71.

KRUPP P, DEV VJ: *Clozapine/Leponex-induced agranulocytosis – The use of hematopoietic growth factors*. Neuropsychopharmacology, 1994; 10 (3S/pt 2): 267S (abs P-174-220).

KUMLIEN E, LUNDBERG PO. *Seizure risk associated with neuroactive drugs: data from the WHO adverse drug reactions database*. Seizure. 2010 Mar; 19(2): 69-73. Epub 2009 Dec 24.

KUMRA S, FRAIZER JA, JACOBSEN LK, et al: *Childhood-onset schizophrenia. A double-blind clozapine-haloperidol comparison*. Arch Gen Psych, 1996; 53(12): 1090-1097.

KUO FJ, LANE HY, CHANG WH: *Extrapyramidal symptoms after addition of fluvoxamine to clozapine*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 483-4.

LADER M: *Experience with clozapine in the United Kingdom*. Presented at the NIMH New Clinical Drug Evaluation Unit Program 31st Annual Meeting. Key Biscayne, Florida, May 28-31, 1991.

LAMBERTENGI DELILIERI G: *Fisiopatologia e clinica dell'agranulocitosi: ruolo dei farmaci antipsicotici*. BMJ, 1993; 88(suppl): 1-8.

LAMMERS CH, DEUSCHLE M, WEIGMANN H, et al: *Coadministration of clozapine and fluvoxamine in psychotic patients: clinical experience*. Pharmacopsychiatry, 1999; 2: 76-77.

LATIF Z, MALIK MA, JABBAR F, AHMED Y, MCDONOUGH C: *Clozapine-induced late leukopenia*. Ir J Med Sci. 2010 Sep 26. [Epub ahead of print]

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

LIEBERMAN JA, JOHNS C, KANE JM, et al: *Clozapine-induced agranulocytosis: Non-cross reactivity with other psychotropic drugs*. J Clin Psychiatry, 1988; 49: 271-277.

LIEBERMAN JA, KANE JM, JOHNS CA: *Clozapine: guidelines for clinical management*. J Clin Psychiatry, 1989; 50: 329-338.

LIEBERMAN JA, SAFFERMAN AZ: *Clinical profile of clozapine: adverse reactions and agranulocytosis*. Psychiatr Q, 1992; 62: 51-70.

LIN JH, LU AYH: *Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 1998; 35: 361-90.

LUBMAN DI, KING JA, CASTLE DJ. *Treating comorbid substance use disorders in schizophrenia*. Int Rev Psychiatry. 2010; 22(2): 191-201.

MARKOWITZ JS, JACKSON CW: *Use of clozapine with nonresponsive patients*. Psychiatr Serv, 1996; 47(12) : 1392.

MATSUDA KT, et al: *Clozapine dosage, serum levels, efficacy, and side-effect profiles: a comparison of Korean-American and Caucasian patients*. Psychopharmacol. Bull., 1996; 32: 253-7.

MATTAI AK, HILL JL, LENROOT RK: *Treatment of early-onset schizophrenia*. Curr Opin Psychiatry. 2010 Jul; 23(4): 304-10.

- MCCARTHY R: *Seizure following smoking cessation in a clozapine responder*. Pharmacopsychiatry, 1994; 27: 210-1.
- MCGINNITY DF, BERRY AJ, KENNY JR, GRIME K, RILEY RJ: *Evaluation of time-dependent cytochrome P450 inhibition using cultured human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2006; 34: 1291-300.
- MELTZER HY, GOODE DJ, SCHYVE PM, et al: *Effect of clozapine on human serum prolactin levels*. Am J Psychiatry, 1979; 136: 1550-1555.
- MELTZER HY: *Clinical studies on the mechanisms of action of clozapine: the dopamin-serotonin hypothesis of schizophrenia*. Psychopharmacology, 1989; 99: S18-S27.
- MELTZER HY: *Clozapine: mechanism of action in relation to its clinical advantages*. In KALES A, STEFANIS CN, TALBOTT JA, eds.: *Recent advances in schizophrenia*. New York, Springer-Verlag, 1990; 237-24.
- MELTZER HY: *Role of serotonin in the action of atypical antipsychotic drugs*. Clin Neurosci, 1995; 3: 64-75.
- MELTZER HY, BOBO WV, LEE MA, COLA P, JAYATHILAKE K. *A randomized trial comparing clozapine and typical neuroleptic drugs in non-treatment-resistant schizophrenia*. Psychiatry Res. 2010 May 30; 177(3): 286-93. Epub 2010 Apr 8.
- MEYER JM: *Individual changes in clozapine levels after smoking cessation: results and a predictive model*. J Clin Psychopharmacol, 2001; 21: 569-74.
- MILLER DD: *Effect of phenytoin on plasma clozapine concentrations in two patients*. J Clin Psychiatry, 1991; 52: 23-35.
- MILLER D: *The clinical use of clozapine plasma concentration in the management of treatment-refractory schizophrenia*. Annals of Clinical Psychiatry, 1996; 8:99-109.
- MONTASTRUC G, FAVRELIERE S, SOMMET A, et al.: *Drugs and dilated cardiomyopathies: A case/noncase study in the French Pharmacovigilance Database*. Br J Clin Pharmacol. 2010 Mar; 69(3): 287-94.
- MOOKHOEK EJ, LOONEN AJ: *Retrospective evaluation of the effect of omeprazole on clozapine metabolism*. Pharm World Scie, 2004; 26: 180-182.
- MOTULSKY AG: *Pharmacogenetics*. Prog Med Genet, 1964; 23: 49-74.

- MUELLER T, BECKER T, FRITZE J: *Neuroleptic malignant syndrome after clozapine plus carbamazepine*. Lancet, 1998; 2: 1500.
- MURRAY M: *Role of CYP pharmacogenetics and drug-drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents*. J Pharm Pharmacol, 2006; 58: 871-875.
- MUSSER WS, WILLS CD, NIMGAONKAR VL: *Is there rapid relapse after discontinuation of clozapine?* Biol Psychiatry, 1994; 35:742 (abs 459).
- NABER D, HOLZBACH R, PERRO C, et al: *Clinical management of clozapine patients in relation to efficacy and side-effects*. Br J Psychiatry, 1992; 160: 54-59.
- NAKAJIMA M, YOKOI T, MIZUTANI M, KINOSHITA M, FUNAYAMA M, KAMATAKI T: *Genetic polymorphism in the 5' -flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans*. J Biochem, 1999; 125: 803-808.
- NG CH, et al: *The emerging role of pharmacogenetics: implications for clinical psychiatry*. Aust. N. Z. J. Psychiatry, 2004; 38: 483-9.
- NG CH, et al: *An inter-ethnic comparison study of clozapine dosage, clinical response and plasma levels*. Int. Clin. Psychopharmacol., 2005; 20: 163-8.
- NIELSEN H: *Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF;filgrastim) treatment of clozapine-induced agranulocytosis*. J Int Med, 1993; 234: 529-531.
- NIELSEN J, MEYER JM: *Risk Factors for Ileus in Patients with Schizophrenia*. Schizophr Bull. 2010 Nov 26. [Epub ahead of print]
- NONGPIUR A, PRAHARAJ SK, SARKAR S, DAS B: *Delayed Onset of Clozapine-Induced Leucopenia*. Am J Ther. 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]
- NYAKYOMA K, MORRISS R: *Effectiveness of Clozapine use in Delaying Hospitalization in Routine Clinical Practice: A 2 year Observational Study*. Psychopharmacol Bull. 2010; 43(2): 67-81.
- OKEY AB: *Enzyme induction in the cytochrome P450 system*. Pharmacol Ther, 1990; 45(2): 241-98.
- OLESEN OV, STARUP G, LINNET K: *Serious drug interaction between clozapine-Leponex and fluvoxamine-Fevarin*. Ugeskr. Lager, 1996; 158: 6931-6932.

- OLESEN OV, LINNET K: *Fluvoxamine-clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism*. J Clin Psychopharmacol, 2000; 20: 35-42.
- OLESEN OV, LINNET K: *Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations*. J Clin Pharmacol, 2001; 41: 823-832.
- OREN R, GRANAT E, SHRTRUSSBERG S, MATZNER Y: *Clozapine-induced agranulocytosis treated with granulocyte macrophage colony stimulating factor*. Br J Psychiatry, 1993; 162: 686-687.
- ORTIZ DE MONTELLANO PR: *The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibitor of cytochrome P450*. Drug Metab Dispos, 1995; 23(11): 1181-7.
- OVERALL JE, GORHAM DR: *The Brief Psychiatric Rating Scale*. Psychological Reports, 1962; 10: 790-812.
- ÖZDEMİR V, KALOW W, POSNER P, COLLINS EJ, KENNEDY JL, TANG BK, ALBERS LJ, REIST C, ROY R, WALKERS W, AFRA P: *CYP1A2 activity as measured by a caffeine test predicts clozapine and active metabolite steady-state concentration in patients with schizophrenia*. J Clin Psychopharmacol, 2001; 21(4): 398-407.
- PALIA SS, CLARKE EJ: *Clozaril withdrawal syndrome*. Psychiatr Bull, 1993; 17: 374-375.
- PANCHERI P: *Farmacoterapia psichiatrica*. Masson, 2003.
- PAPETTI F, MOREL-PINGAUL V, BUISSE V, MAZIERE L, BANAYAN M, THAUBY S, BESNARD T, DAR COURT G, PRINGUEY D: *Clozapine-resistant schizophrenia related to an increased metabolisms and benefit of fluvoxamine: four case report*. Encephale, 2007; 33(5): 811-8.
- PERRY PJ, MILLER DD, ARNDT SV, CADORET RJ: *Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients*. Am J Psychiatry, 1991; 148: 231-235.
- PHILPOT RM: *Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues*. Methods Enzymol, 1991; 206: 623-31.
- PINNINTI NR, DE LEON J: *Interaction of sertraline with clozapine*. J Clin Psychopharmacol, 1997; 17: 119-120.

POLLAK P, TISON F, et al: *Clozapine in drug induced psychosis in Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled study with open follow up.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004; 75: 689-695.

POPE HG, COLE JO, CHOPAS PT: *Apparent neuroleptic malignant syndrome associated with clozapine and lithium.* J Nerv Ment Dis, 1986; 174 : 493-495.

POTKIN SG, BERA R, GULASEKARAM B, et al: *Plasma clozapine concentrations predict clinical response in treatment-resistant schizophrenia.* J Clin Psychiatry, 1994; 55: 133-136.

PRAMYOTHIN P, KHAODHIAR L. *Metabolic syndrome with the atypical antipsychotics.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010 Oct; 17(5): 460-6.

PRIOR TI, CHUE PS, TIBBO P, BAKER GR: *Drug metabolism and atypical antipsychotics.* Eur Neuropsychopharmacol, 1999; 9: 301-309.

QUARTESAN R, ALBRIGO D, CAPORALI B, FERRINI R: *Citocromo P450. Interazioni farmacologiche.* CIC, Edizioni Internazionali – Roma, 2002.

RAASKA K, NEUVONEN PJ: *Ciprofloxacin increases serum clozapine and N-desmethylclozapine: a study in patients with schizophrenia.* Eur J Clin Pharmacol, 2000; 56(8): 585-9.

RAGGI MA, MANDRIOLI R, SABBIONI C, et al: *Atypical antipsychotics: pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring and pharmacological implications.* Curr Med Chem, 2004; 11: 279-296.

REINACH B, DE SOUSA G, DOSTERT P, et al: *Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP- glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes.* Chem Biol Interact, 1999; 121: 37-48.

RONALDSON KJ, TAYLOR AJ, FITZGERALD PB, TOPLISS DJ, ELSIK M, MCNEIL JJ: *Diagnostic characteristics of clozapine-induced myocarditis identified by an analysis of 38 cases and 47 controls.* J Clin Psychiatry. 2010 Aug; 71(8): 976-81. Epub 2010 Mar 9.

ROSENHECK R, LAWSON W, CRAYTON J, et al: *Predictors of differential response to clozapine and haloperidol. Veterans Affairs Cooperative Study Group on Clozapine in Refractory Schizophrenia.* Biol Psych, 1998; 44: 475-482.

- RUMMEL-KLUGE C, KOMOSSA K, SCHWARZ S, HUNGER H, SCHMID F, LOBOS CA, et al.: *Head-to-head comparisons of metabolic side effects of second generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis*. Schizophr Res. 2010 Nov; 123(2-3): 225-33. Epub 2010 Aug 7.
- RYABIK BM, NGUYEN VT, MANN RM, SMITH JD, LIPPMANN SB: *Clozapine-induced agranulocytosis and colony-stimulating cytokines*. Gen Hosp Psychiatry, 1993; 15: 263-265.
- SACHSE C, BROCKMÖLLER J, BAUER S, ROOTS I: *Functional significance of a C-A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine*. Br J Clin Pharmacol, 1999; 47: 445-49.
- SACHSE C, BHAMBRA U, SMITH G, LIGHTFOOT TJ, BARRETT JH, SCOLLAY J, et al.: *Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism*. Br J Clin Pharmacol, 2003; 55: 68-76.
- SAFFERMAN AZ, LIEBERMAN JA, KANE JM, et al: *Update on the clinical efficacy and side effects of clozapine*. Schizophr Bull, 1991; 17: 247-258.
- SAGUD M, MIHALJEVIĆ-PELES A, MÜCK-SELER D, et al.: *Smoking and schizophrenia*. Psychiatr Danub. 2009 Sep; 21(3): 371-5.
- SAUNDERS KE, HAWTON K: *The role of psychopharmacology in suicide prevention*. Epidemiol Psychiatr Soc. 2009 Jul-Sep; 18(3): 172-8.
- SCHMAUSS M, WOLFF R, ERFURTH A, RÜTHER E: *Tolerability of long term clozapine treatment*. Psychopharmacology, 1989; 99: S105-S108.
- SCHMIDER J, GRENBLATT DJ, von MOLTKE LL, KARSOV D, SHADER RI: *Inhibition of CYP2C19 by selective serotonin reuptake inhibitors in vitro: studies of phenytoin p-hydroxylation*. Br J Clin Pharmacol, 1997; 44: 495-8.
- SHADER RI, GREENBLATT DJ: *Clozapine and fluvoxamine, a curious complexity*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 101-102.
- SHENG-NAN WU, et al: *Association of DRD2 polymorphism and chlorpromazine-induced extrapyramidal syndrome in Chinese schizophrenic patients*. Acta Pharmacologica Sinica, 2006; 27(8): 966-70.

SHIMADA T, YAMAZAKI H, MIMURA M, INUI Y, GUENGERICH FP: *Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994; 270(1): 414-23.

SHIRLEY KL, HON YY, PENZAK SR, LAM YW, SPRATLIN V, JANN MW: *Correlation of cytochrome P450(CYP)1A2 activity using caffeine phenotyping and olanzapine disposition in healthy volunteers*. Neuropsychopharmacology, 2003; 28: 961-966.

SIMPSON GM, VARGA E: *Clozapine: a new antipsychotic agent*. Curr Ther Res, 1974; 16: 679-686.

SOUZA RP, et al. (a): *Influence of neurexin 1 (NRXN1) polymorphisms in clozapine response*. Hum Psychopharmacol. 2010 Sep 22. [Epub ahead of print]

SOUZA RP, et al. (b): *Influence of serotonin 3A and 3B receptor genes on clozapine treatment response in schizophrenia*. Pharmacogenet Genomics. 2010 Apr; 20(4): 274-6.

SOUZA RP, et al. (c): *Genetic association of the GDNF alpha-receptor genes with schizophrenia and clozapine response*. J Psychiatr Res. 2010 Aug; 44(11): 700-6. Epub 2010 Jan 29.

SPINA E, AVENOSO A, FACCIOLÁ G, et al: *Effect of fluoxetine on the plasma concentrations of clozapine and its major metabolites in patients with schizophrenia*. Int Clin Psychopharmacol, 1998; 13: 141-5.

SPINA E, AVENOSO A, FACCIOLÁ G, SCORDO MG, ANCIONE M, MADIA AG, VENTIMIGLIA A, PERUCCA E: *Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics*. Psychopharmacology, 2000; 148: 83-89.

SPINA E, PERUCCA E: *Clinical significance of pharmacokinetic interactions between antiepileptic and psychotropic drugs*. Epilepsia, 2002; 43 (Suppl 2): 37-44.

SPINA E, DE LEON J: *Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2007; 100: 4-22.

STAHL S: *Psicofarmacologia essenziale*. Centro Scientifico Ed., 2002.

SWIFT R: *Medications acting on the dopaminergic system in the treatment of alcoholic patients*. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(19): 2136-40.

SZEGEDI A, WIESNER J, HIEMKE C: *Improved efficacy and fewer side effects under clozapine treatment after addition of fluvoxamine*. *J Clin Psychopharmacol*, 1995; 15: 141-143.

SZEGEDI A, ANGHELESCU I, WIESNER J, et al: *Addition of low-dose fluvoxamine to low-dose clozapine monotherapy in schizophrenia: drug monitoring and tolerability data from a prospective clinical trial*. *Pharmacopsychiatry*, 1999; 32(4): 148-53.

SZYMANSKI S, JODY D, LEIPZIG R, et al: *Anticholinergic delirium caused by re-treatment with clozapine*. *Am J Psychiatry*, 1991; 148: 1752.

TANTCHEVA-POOR I, ZAIGLER M, RIETBROCK S, FUHR U: *Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test*. *Pharmacogenetics*, 1999; 9: 131-144.

TAYLOR D, ELLISON Z, EMENTON SHAW L, et al: *Co-administration of citalopram and clozapine: effect on plasma clozapine levels*. *Int Clin Psychopharmacol*, 1998; 13: 19-21.

TECHNOLOGY EVALUATION CENTER: *Special Report Genotyping for Cytochrome P450 Polymorphism to determinate drug-metabolizer status*. Tec Program., 2004 Dec.

TIIHONEN J, NOUSIAINEN U, HAKOLA P, et al: *EEG abnormalities associated with clozapine treatment (letter)*. *Am J Psychiatry*, 1991; 148: 1486.

TIIHONEN J, VARTIAINEN H, HAKOLA P: *Carbamazepine-induced changes in plasma levels of neuroleptics*. *Pharmacopsychiatry*, 1995; 28: 26-8.

TIIHONEN J, LÖNNQVIST J, WAHLBECK K, et al.: *11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study)*. *Lancet*. 2009 Aug 22; 374(9690): 620-7.

THORUP M, FOG R: *Clozapine treatment of schizophrenic patients: plasma concentration and coagulation factors*. *Acta Psychiatr Scand*, 1977; 66: 123-126.

TODESCO L, TÖRÖK M, KRÄHENBÜHL S, WENK M: *Determination of -3858G-->A and -164C-->A genetic polymorphisms of CYP1A2 in blood and saliva by rapid allelic discrimination: large difference in the prevalence of the -3858G-->A mutation between Caucasians and Asians*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003; 59(4): 343-6.

- TOPIWALA A, SEENA S: *The pharmacological management of violence in schizophrenia: a structured review*. Expert Rev Neurother. 2011 Jan; 11(1): 53-63.
- ULRICH S, BAUMAN B, et al: *Therapeutic drug monitoring of clozapine and relapse – A retrospective study of routine clinical data*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2003; 41(1): 3-13.
- VAINER JL, CHOUNARD G: *Interaction between caffeine and clozapine*. J Clin Psychopharmacol, 1994; 14: 284-285.
- VALEVSKI A, KLEIN T, GAZIT E, MEGED S, STEIN D, ELIZUR A, NARINSKY ER, KUTZUK D, WEIZMAN A: *HLA-B38 and clozapine-induced agranulocytosis in Israeli Jewish schizophrenic patients*. Eur J Immunogenet, 1998; 25(1): 11-3.
- VAMPINI C, BELLANTUONO C: *Psicofarmaci e anziani*. Il Pensiero Scientifico Ed., 2002.
- VANDERZWAAG C, MCGEE M, MCEVOY JP, et al: *Response of patients with treatment-refractory schizophrenia to clozapine within three serum level ranges*. Am J Psych, 1996; 153: 1579-1584.
- VESELL ES: *Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies*. Pharmacol. Ther., 1989; 41, 535-52.
- VOGEL F: *Moderne Probleme der Humangenetik*. Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk, 1959; 12: 52-125.
- WAGSTAFF AJ, BRYSON HM: *Clozapina: review delle caratteristiche farmacologiche e dell'impiego in pazienti schizofrenici resistenti od intolleranti ai neurolettici classici*. CNS Drugs, 1995; 4: 370-400.
- WAGSTAFF AJ, PERRY G: *Clozapine. In prevention of suicide in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder*. CNS Drugs, 2003; 17(4): 273-80.
- WAHLBECK K, CHEINE M, ESSALI A, ADAMS C: *Evidence of clozapine effectiveness in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized trials*. Am J Psych, 1999; 156: 990-999.
- WALKER H, MACAULAY K: *Assessment of the side effects of antipsychotic medication*. Nursing Standard, 2005; 19, 40, 41-46.
- WANG B, ZHOU SF. *Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development*. Curr Med Chem. 2009; 16(31): 4066-218.

WELFARE MR, AITKIN M, BASSENDINE MF, DALY AK: *Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians*. Pharmacogenetics, 1994; 9: 367–375.

WETZEL H, ANGHELESCU I, SZEGEDI A, et al: *Pharmacokinetic interactions of clozapine with selective serotonin reuptake inhibitors: differential effects of fluoxetine and paroxetine in a prospective study*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 2-9.

WILFFERT B, et al: *Pharmacogenetics as a tool in the therapy of schizophrenia*. Pharm World Science, 2005; 27(1): 20-30.

WINDFUHR K, TURNBULL P, WHILE D, SWINSON N, MEHTA H, HADFIELD K, et al.: *The incidence and associated risk factors for sudden unexplained death in psychiatric in-patients in England and Wales*. J Psychopharmacol. 2010 Oct 15. [Epub ahead of print]

WOOD LD, NEUMILLER JJ, SETTER SM, DOBBINS EK: *Clinical review of treatment options for select nonmotor symptoms of Parkinson's disease*. Am J Geriatr Pharmacother. 2010 Aug; 8(4): 294-315.

XU M, XING Q, LI S, ZHENG Y, WU S, GAO R, et al.: *Pharmacogenetic effects of dopamine transporter gene polymorphisms on response to chlorpromazine and clozapine and on extrapyramidal syndrome in schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010 Aug 16; 34(6): 1026-32. Epub 2010 May 24.

YADAV PN, ABBAS AI, FARRELL MS, et al.: *The Presynaptic Component of the Serotonergic System is Required for Clozapine's Efficacy*. Neuropsychopharmacology. 2010 Nov 3. [Epub ahead of print]

YAMIN S, VADDADI K. *Are we using excessive neuroleptics? An argument for systematic neuroleptic dose reduction in stable patients with schizophrenia with specific reference to clozapine*. Int Rev Psychiatry. 2010; 22(2): 138-47.

YUNIS JJ, CORZO D, SALAZAR M, LIEBERMAN JA, HOWARD A, YUNIS EJ: *HLA association in clozapine induced agranulocytosis*. Blood, 1995; 86(3): 1177-83.

ZAHODNE LB, FERNANDEZ HH: *Parkinson's psychosis*. Curr Treat Options Neurol. 2010 May; 12(3): 200-11.

ZEVIN S, BENOWITZ NL: *Drug interactions with tobacco smoking: an update*. Clin Pharmacokinet, 1999; 36: 425-438.

ZHORNITSKY S, RIZKALLAH E, PAMPOULOVA T, CHIASSON JP, STIP E, ROMPRÉ PP, POTVIN S: *Antipsychotic agents for the treatment of substance use disorders in patients with and without comorbid psychosis*. J Clin Psychopharmacol. 2010 Aug; 30(4): 417-24.

ZHOU SF, WANG B, YANG LP, LIU JP. *Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2*. Drug Metab Rev. 2010 May; 42(2): 268-354.

ZORN SH, JONES SB, WARD KM, LISTON DR: *Clozapine is a potent and selective muscarinic M4 receptor agonist*. Eur J Pharmacol, 1994; 269(3): R1-2.

ZULLINO DF, DELESSERT D, EAP CB, PREISIG M, BAUMANN P: *Tabacco and cannabis smoking cessation can lead to intoxication with clozapine or olanzapine*. Int Clin Psychopharmacol, 2002; 17: 141-143.