



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO

SCUOLA DI BIOSCIENZE E MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea in
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE
(CLASSE 13)

**ANALISI DEL POLIMORFISMO GENETICO DEL TRASPORTATORE
DELLA SEROTONINA (5-HTTLPR) IN PAZIENTI AFFETTI DA
SINDROME FIBROMIALGICA**

Laureando

Giacomo Giuliani

Tutor Unicam

Prof. Francesco Alessandro Palermo

Tutor aziendale

Dott. Paolo Cocci

ANNO ACCADEMICO 2016 / 2017

“...] In un universo di cieche forze fisiche e di duplicazione genetica, alcune persone rimangono danneggiate mentre altre sono fortunate, e in tutto ciò non vi è né ragione né giustizia [...] Il DNA non sa nulla e non si cura di nulla. Il DNA, semplicemente, è. E noi danziamo alla sua musica.”

Richard Dawkins

INDICE

Capitolo 1

1.1 FIBROMIALGIA

1.2 IL GENOMA UMANO

1.3 SISTEMA NERVOSO E SEROTONINA (5-HT)

1.3.1 TRASPORTATORE SEROTONINA (5-HTT)

1.4 ENZIMA DI CONVERSIONE DELL'ANGIOTENSINA (ACE)

1.5 METILENE TETRAIDROFOLATO REDUTTASI (MTHFR)

1.6 SCOPO DELLO STUDIO

Capitolo 2

2.1 RACCOLTA CAMPIONI ED ESTRAZIONE DEL DNA DA CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO

2.2 ANALISI DEL POLIMORFISMO 5-HTTLPR MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

2.3 ANALISI DEL POLIMORFISMO I/D (ACE) MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

2.4 ANALISI DEL POLIMORFISMO C677T (MTHFR) MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

2.4.1 RESTRIZIONE ENZIMATICA

Capitolo 3

3.1 RISULTATI E DISCUSSIONE

Bibliografia

Ringraziamenti

CAPITOLO 1

1.1 FIBROMIALGIA

La fibromialgia è una sindrome idiopatica ovvero un insieme di sintomi e manifestazioni cliniche a carico dell'apparato muscolo-scheletrico che non ha una causa certa ma che è riscontrabile in tante altre patologie. In genere, si stima che la fibromialgia colpisca circa l'1-5% della popolazione, principalmente di sesso femminile, tra i 25 ed i 55 anni (*Bennett et al., 2009; Wolfe et al., 2010*).

La patologia è caratterizzata dalla presenza di dolore cronico diffuso, accompagnato da una variegata sintomatologia: fatica cronica, disturbi del sonno, rigidità articolare e depressione (*Maletic et al., 2009; Sommer et al., 2012*). I sintomi associabili alla fibromialgia sono stati descritti per la prima volta nell'800 (*Mease, 2005*), mentre negli anni '70 è stata coniata la denominazione di "FIBROMIALGIA" la quale descrive il significato patologico della malattia: FIBRO (tessuto fibroso) MIA (tessuto muscolare) ALGIA (dolore) (*Jain et al., 2003*). Il dolore è il sintomo più caratteristico della patologia ed è descritto come una sensazione intensa di bruciore o formicolio su tutto il corpo ed in profondità nei muscoli (*Jain et al., 2003; Starz and Vogt, 2008; Staud, 2009; Watson et al., 2009*). Questo potrebbe manifestarsi improvvisamente o in seguito ad un trauma fisico e/o emotivo. In altri casi, invece, il dolore può gradualmente intensificarsi negli anni (*Starz and Vogt, 2008; Watson et al., 2009*). I pazienti affetti da fibromialgia possono anche lamentare un'alterazione del corretto riposo notturno; i disturbi del sonno infatti sono presenti in più del 90% dei soggetti affetti da fibromialgia (*Bigatti et al., 2008; Holman, 2008*). Tale condizione potrebbe dipendere dai bassi livelli di ormone della crescita (GH), ormone che svolge un ruolo fondamentale nel controllo dello stadio 4 della fase NREM del sonno (sonno molto profondo) (*Mease, 2005*). Inoltre, è stato dimostrato che interrompendo il riposo notturno in modo sistematico si riduce in maniera significativa la soglia del dolore (*Lentz et al., 1999*) con conseguente intensificarsi della percezione del dolore.

Per quanto riguarda la diagnosi di fibromialgia, questa risulta essere molto difficile in quanto, al momento, non esistono tests di laboratorio specifici per tale patologia. Prima del 2010, l'American College of Rheumatology (ACR) aveva elencato una serie di criteri al fine di diagnosticare la fibromialgia, basati principalmente sullo studio di alcuni "Tender Points" (punti dolorosi) (Figura 1) e sull'analisi del grado di percezione del dolore. In breve, i Tender Points sono dei punti nel corpo, più precisamente 18, in cui in seguito alla

digitopressione il paziente manifesta elevato dolore. Al fine di diagnosticare la patologia era necessario che almeno 11 punti presentassero dolore intenso (Figura 1) (Wolfe et al., 1990).

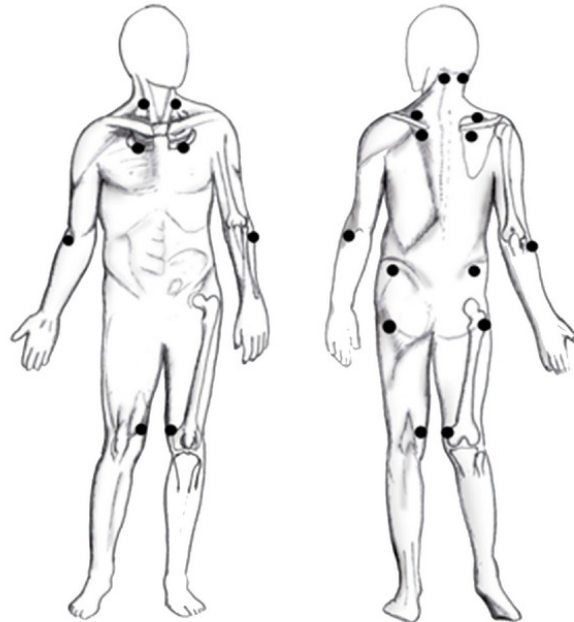


Figura 1: Tender Points (Bellato et al., 2012)

Tuttavia tale sistema di indagine non si è rivelato attendibile in quanto i punti di maggiore percezione del dolore sono differenti tra i vari pazienti e spesso il dolore non è costante lungo l'arco della giornata subendo delle variazioni significative. Per questo motivo nel 2010 l'ACR ha imposto nuovi parametri diagnostici più accurati, inquadrando con esattezza i sintomi di un paziente fibromialgico tramite la formulazione di un questionario autovalutativo (Fibromyalgia Survey Questionnaire, FSQ). Tale questionario risulta essere di estrema utilità per favorire la diagnosi da parte del medico curante (Sommer et al., 2012). Dal momento che la variabilità individuale e la concomitanza di sintomi simili ad altre patologie possono simulare la sindrome fibromialgica durante la diagnosi è molto importante escludere a priori la presenza di altre malattie.

Sebbene si conosca abbastanza sulla fisiopatologia della malattia, molto rimane da studiare per quanto riguarda l'eziologia. Infatti, si ritiene che l'insorgenza della fibromialgia implichi l'interazione tra numerosi fattori quali: fattori psicologici, genetici, neurobiologici ed ambientali (Abeles et al., 2007). Recentemente è stata individuata una consistente familiarità della patologia; per questo motivo gli studi attuali si sono incentrati sulla predisposizione genetica e sull'analisi dei vari genotipi (Buskila et al., 2006)

1.2 IL GENOMA UMANO

L'essere umano, come tutte le forme viventi, possiede all'interno di ogni singola cellula del corpo il patrimonio genetico che è stato ereditato dal padre e dalla madre. Il patrimonio genetico è composto da 46 cromosomi, ventidue coppie di autosomi più due cromosomi sessuali. All'interno di ogni coppia di cromosomi sono presenti tutte le informazioni necessarie per caratterizzare il fenotipo di un organismo, come ad esempio il colore degli occhi. Tuttavia l'informazione contenuta nel gene presente nei due cromosomi omologhi può essere differente e questo definisce i caratteri come dominanti, recessivi o codominanti. Le forme alternative del gene vengono definite come "Alleli": controllano lo stesso carattere, ma con prodotti fenotipicamente diversi.

Il patrimonio genetico osservato a livello macroscopico è uguale in tutta la popolazione. Nel 2003 al termine del progetto "Genoma umano" in cui è stato interamente sequenziato il DNA si è appreso che il patrimonio genetico di *Homo sapiens* è composto da 6 miliardi di nucleotidi che definiscono 25 mila geni attualmente noti. Un individuo differisce da un altro poiché possiede alleli diversi per uno stesso gene. Casualmente un gene può subire mutazioni in seguito a varie interazioni fisico-ambientali. Se una mutazione avviene a carico delle cellule germinali questa verrà trasmessa alla progenie. Quando le mutazioni genetiche sono presenti in più dell'1% all'interno della popolazione vengono definite polimorfismi. Attualmente la ricerca è focalizzata sullo studio dei diversi polimorfismi al fine di identificare una correlazione con l'insorgenza di varie patologie (Watson et al., 2015).

1.3 SISTEMA NERVOSO E SEROTONINA

Il sistema nervoso ha ricoperto un ruolo molto importante nell'arco dell'evoluzione, permettendo un migliore sviluppo e controllo delle varie funzioni del corpo, conferendo così a chi ne era dotato un forte vantaggio evolutivo. A seconda della localizzazione anatomica il sistema nervoso è suddiviso in sistema nervoso centrale, periferico e vegetativo. In maniera semplificativa possiamo affermare che il sistema centrale comprende il cervello e il midollo spinale, il periferico i nervi spinali e cranici ed il vegetativo comprende regioni del corpo deputate al controllo viscerale.

Il sistema nervoso è fondamentalmente composto da due tipi di cellule: i neuroni e le cellule gliali (cellule di supporto).

I neuroni a loro volta sono composti da un corpo cellulare nucleato dotato di estroflessioni (assoni e dendriti) tramite le quali prende contatto, e quindi comunica, con i neuroni adiacenti.

La comunicazione può essere di tipo elettrico con il solo propagarsi del potenziale di azione, o chimica con il rilascio di neurotrasmettitori in grado di tramettere diversi segnali in base all'area del sistema nervoso in cui si trovano. Il luogo in cui avviene il passaggio delle informazioni viene definito come sinapsi.

Recentemente è stato dimostrato che la fibromialgia può essere associata a disturbi del metabolismo della serotonina. Infatti i livelli di questo neurotrasmettitore ed i relativi metaboliti risultano essere più bassi nel siero e nel liquido cerebrospinale nei pazienti affetti da fibromialgia (Wolfe et al., 1997; Russell et al., 1992).

La serotonina è stata isolata per la prima volta in alcuni anfibi nel 1935 dal farmacologo italiano Vittorio Erspamer. Chimicamente essa è una ammina che fa parte della famiglia dei composti aromatici denominati indoli, i quali presentano un anello a cinque atomi contenente azoto condensato con un anello benzenico.

I neuroni serotoninergici si trovano principalmente a livello dei nuclei del rafe che regolano il ritmo sonno-veglia e l'atteggiamento emotivo.

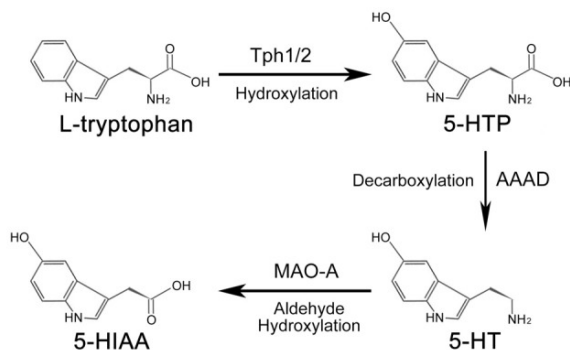


Figura 2: Sintesi e metabolismo della serotonina (Junhua et al., 2017)

La serotonina (5-HT) quindi è un neurotrasmettitore che regola fondamentali aspetti dello sviluppo, della fisiologia e del comportamento del cervello.

Il sistema della serotonina è altamente regolato e complesso. In primo luogo la sintesi di questa monoammina (Figura 2) necessita della presenza del triptofano come substrato, un amminoacido essenziale ingerito con la dieta. Questo amminoacido una volta penetrato negli assoni delle cellule del sistema nervoso viene idrossilato ad idrossi triptofano ad opera di una idrossilasi specifica e successivamente decarbossilato a 5-idrossitriptamina o serotonina da una decarbossilasi non specifica. La serotonina viene poi racchiusa in vescicole e veicolata da un trasportatore magnesio-dipendente "V-MAT" (vesicular monoamine transporter) a livello pre-sinaptico, in attesa di un impulso di

depolarizzazione che ne permetta l'esocitosi. La serotonina, una volta secreta nello spazio inter-sinaptico, inizialmente si lega a specifici recettori accoppiati a proteine G situati nella membrana post sinaptica. Successivamente essa viene selettivamente rimossa dal trasportatore della serotonina (5-HTT), posto nella membrana presinaptica o alternativamente rimossa non selettivamente da trasportatori di altri neurotrasmettitori (Figura 3). A questo punto la serotonina può essere reintrodotta nello spazio sinaptico o degradata ad opera di enzimi posti nella membrana esterna dei mitocondri, le monoamminoossidasi (mao-A e mao-B), formando l'acido 5-idrossi-indolacetico che verrà irreversibilmente eliminato. Oltre che nei neuroni serotoninergici, la serotonina si trova attiva in altre cellule, come le piastrine, i mastociti, e le cellule enterocromaffini dell'intestino (Siliprandi et al., 2011). Recenti studi di correlazione tra la fibromialgia e la serotonina hanno aperto la strada all'ipotesi che anche il 5-HTT possa avere un ruolo chiave nell'insorgenza della patologia.

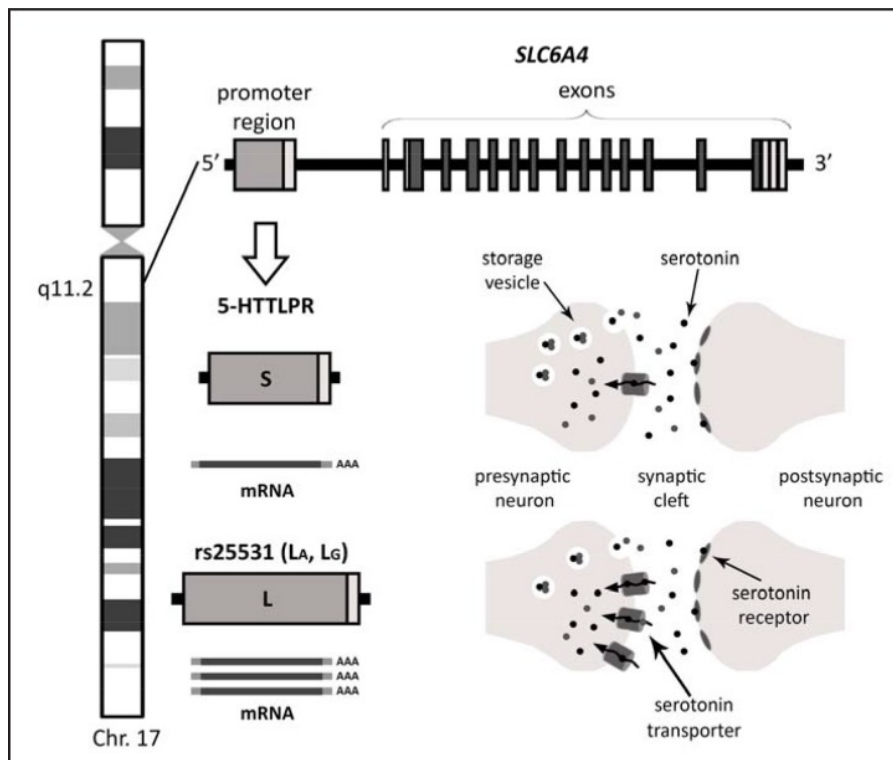


Figura 3: Polimorfismo 5-HTTLPR nella regione promotrice del gene SLC6A4 che codifica per il trasportatore della serotonina 5-HTT. In evidenza il meccanismo fisiologico di trasporto e riciclo della Serotonina (Oliveira et al., 2016) .

1.3.1 TRASPORTATORE SEROTONINA

Il 5-HTT è noto come trasportatore di serotonina sodio-dipendente ed è codificato dal gene SLC6A4 che si trova nel cromosoma 17q11.1-17q12, composto da 14 esoni che si

estendono per 40 mila basi. La sequenza del gene codifica per una proteina di 630 aminoacidi con 12 domini transmembrana (Figura 3) (Lesch et al., 1993).

Il 5-HTT regola la durata e l'intensità delle funzioni biologiche trasmesse dalla serotonina, agendo come un modulatore della segnalazione di quest'ultima (Lurescia et al., 2017). Questo trasportatore risulta essere una proteina bersaglio di numerosi farmaci il cui scopo è quello di inibirne la funzionalità così da aumentare l'attività della serotonina. Recentemente è stata osservata una presunta correlazione tra la fibromialgia e la presenza di polimorfismi nella regione del promotore a monte del gene che codifica per il 5-HTT (SLC6A4) (Arnold et al., 2013). Tra le varianti funzionali del gene per il trasportatore della serotonina particolare attenzione è stata posta al polimorfismo 5-HTTLPR (serotonin-transporter-linked polymorphic region), caratterizzato da una inserzione/delezione di 44 paia di basi nella regione promotore (Lesch et al., 1993). Le varianti di questa regione sono state quindi indicate come "L, lunga" (presenza di inserzione) o "S, corta" (delezione). In particolare la variante lunga (L), sarebbe responsabile di un incremento della trascrizione del gene (Heils et al., 1996) con conseguente aumento della concentrazione del trasportatore a livello del sistema nervoso. Di conseguenza i soggetti che presentano il polimorfismo "S" hanno elevati livelli di serotonina extracellulare libera dal momento che viene meno il meccanismo di 're-uptake' mediato dal 5-HTT. In questo caso un incremento cronico della serotonina porta a una desensibilizzazione del recettore 5-HT1A con conseguente alterazione della trasmissione del segnale sinaptico (Watanabe et al., 2011).

1.4 ENZIMA DI CONVERSIONE DELL'ANGIOTENSINA (ACE)

Uno studio recente ha per la prima volta dimostrato una relazione significativa tra un polimorfismo del gene che codifica per l'enzima convertitore dell' angiotensina (ACE) e la suscettibilità allo sviluppo della fibromialgia (Inanir et al., 2015).

L'ACE è una metallopeptidasi contenente zinco, più precisamente una carbossi esopeptidasi costituita da 1306 amminoacidi, ampiamente distribuita sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi nel polmone e nei reni (Erdos et al., 1987). Al momento l'ACE è principalmente studiato come mediatore chiave in due processi fisiologici fondamentali come la regolazione della pressione sanguigna e il controllo dei processi di infiammazione.

La pressione sanguigna viene controllata principalmente dal sistema "renina-angiotensina-aldosterone". Le cellule dell'apparato juxtaglomerulare del rene producono un enzima, la Renina, il quale attraverso il flusso ematico converte l'angiotensinogeno

prodotto dal fegato in angiotensina I. Quest'ultima viene a sua volta convertita dall'ACE in angiotensina II (Figura 4), prodotto che ha numerose funzioni, tra cui le più importanti riguardano appunto l'aumento della pressione sanguigna (Rhoades et al., 2003).

Nel dettaglio, l'ACE converte il decapeptide inattivo angiotensina I nell'ottapeptide attivo angiotensina II.

Un altro ruolo fondamentale dell'ACE è quello di mediare i processi nel sistema Chinina-Callicreina. Esso interviene, infatti, nella modulazione della risposta infiammatoria metabolizzando e disattivando la bradichinina (Figura 4).

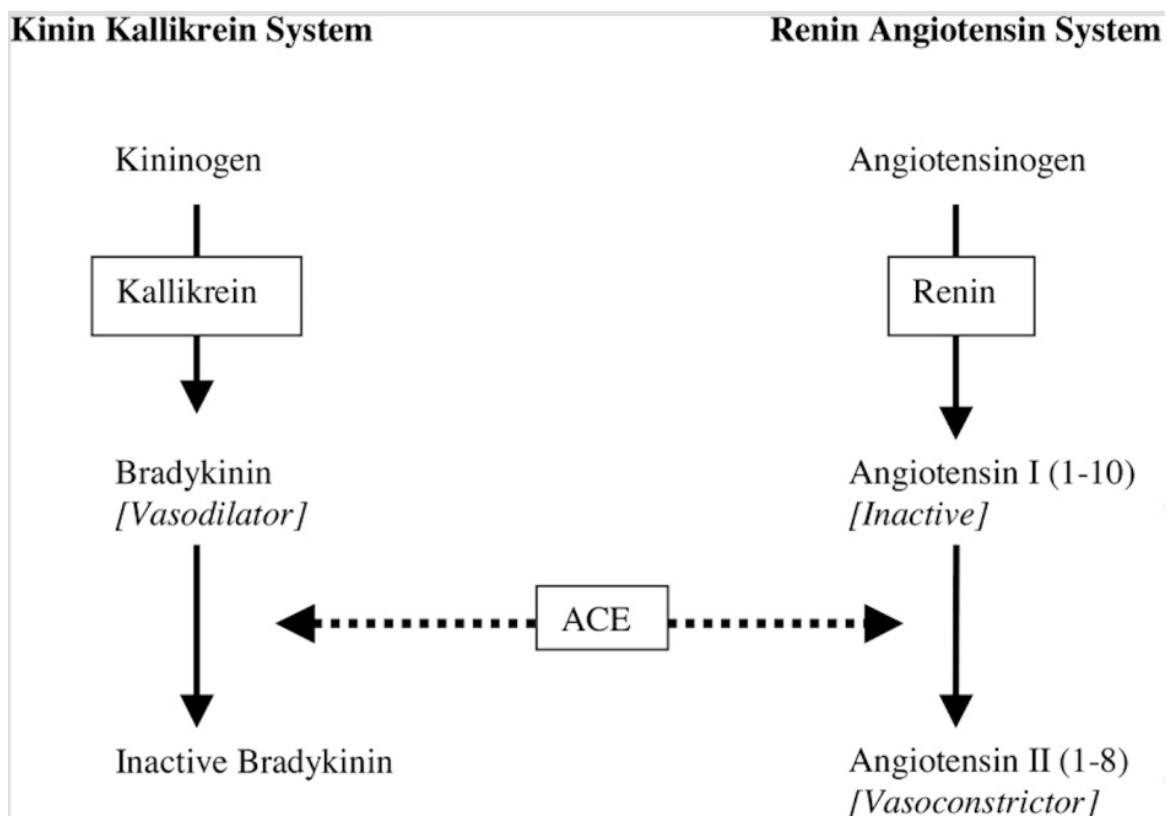


Figura 4: Sistema Chinina-Callicreina e Renina-Angiotensina (Sayed-Tabatabaei et al., 2006)

Le neurochinine, compresa la bradichinina, sono una famiglia di neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale (SNC) che svolgono un ruolo chiave nella regolazione delle emozioni e delle risposte infiammatorie e immunitarie. Infatti esse sono in grado di modulare la trasmissione del dolore grazie alla riduzione della soglia di eccitabilità dei nocicettori, aumentando così la frequenza di impulso nervoso e quindi la sensazione dolorifica (Jaspard et al., 1993; Yokosawa et al., 1983). Effetto analogo è svolto anche da

serotonina, adrenalina, istamina, sostanza P e prostaglandine prodotte durante un evento infiammatorio.

A livello molecolare il gene che codifica per l'ACE si trova sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q23), è lungo 21 mila basi e comprende 26 esoni e 25 introni. Nel 1990 è stato trovato un polimorfismo nel sedicesimo introne caratterizzato dalla presenza (inserzione, I) o dall'assenza (delezione, D) di una sequenza di 287 basi. È stato osservato che i livelli di attività enzimatica negli omozigoti con genotipo D/D erano circa il doppio di quelli misurati negli omozigoti con genotipo I/I (*Rigat et al., 1990*). I soggetti con genotipo I/D (eterozigoti) presentavano livelli intermedi, indicativi di un fenomeno di codominanza. Successivamente è stato dimostrato che il polimorfismo I/D non è coinvolto nella regolazione dell'attività di ACE solo nel plasma ma anche a livello tissutale (*Costerousse et al., 1993; Danser et al., 1995*).

Sebbene il polimorfismo dell'ACE sia ampiamente studiato per stabilire eventuali correlazioni con varie patologie, la sua presenza in una regione non codificante (introne 16) del genoma farebbe supporre che sia improbabile una variazione totale nella funzionalità dell'enzima. Tuttavia tale polimorfismo risulta essere estremamente importante per gli studi di associazione tra i vari genotipi e le diverse condizioni patofisiologiche.

1.5 METILENE TETRAIDROFOLATO REDUTTASI (MTHFR)

Nello stesso studio di Inanir et al. (2015) gli autori hanno evidenziato una correlazione tra alcuni dei sintomi della fibromialgia ed un polimorfismo presente sul gene che codifica per la MTHFR.

La metilene tetraidrofolato reduttasi è un enzima coinvolto nel metabolismo della metionina, un amminoacido idrofobico solforato, naturalmente presente nelle proteine alimentari sia vegetali che animali. Questo enzima catalizza la formazione di un substrato necessario per formare la metionina a partire dall'omocisteina così da permetterne l'utilizzo per varie funzioni biologiche dell'organismo, come la sintesi proteica (Figura 5).

L'attività dell'enzima è influenzata dai livelli di vitamine B6, B12 e folati, che sono facilmente assimilabili con una dieta varia ed equilibrata.

Tuttavia esistono delle mutazioni genetiche che possono alterare la capacità catalitica di questo enzima, portando ad un accumulo di omocisteina nel plasma con insorgenza di varie patologie ad essa associate, come l'arteriosclerosi, l'infarto, l'ictus, la trombosi, la spina bifida nei neonati, le problematiche di gestazione (*Stephan et al., 2015*).

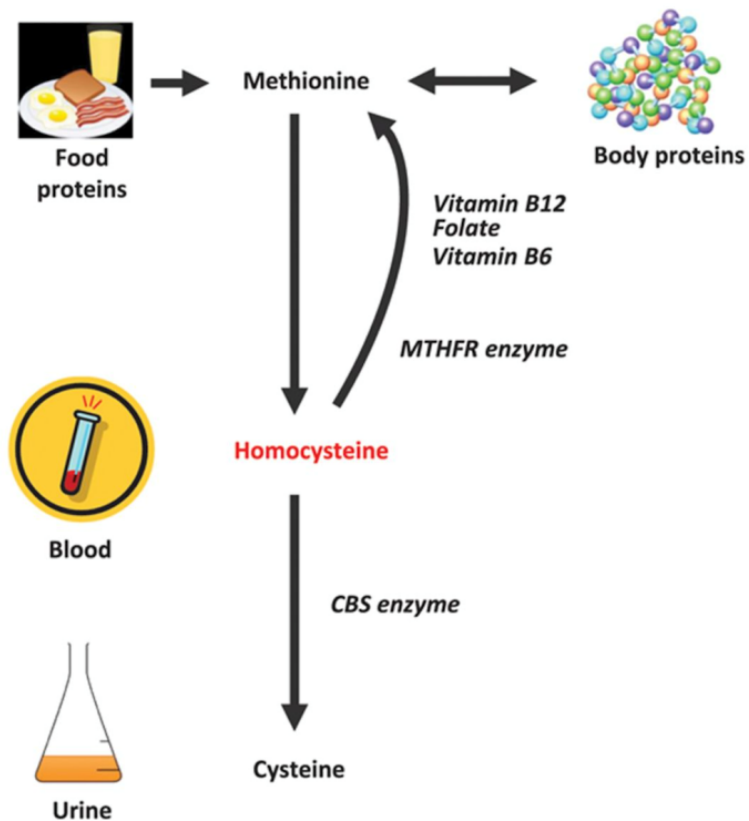


Figura 5: Metabolismo omocisteina (Stephan et al., 2015)

Il gene che codifica per l'MTHFR è costituito da 2000 paia di basi, 11 esoni ed è localizzato nel cromosoma 1p36.3. Fino ad ora sono stati identificati e caratterizzati 60 polimorfismi all'interno di questo gene (Leclerc et al., 2007). Il più comune è il polimorfismo C677T che si caratterizza per una sostituzione di una citosina con una timina all'interno del quarto esone e al nucleotide in posizione 677. La sostituzione di questa singola base produce una variazione di un amminoacido nella proteina finale, sostituendo un'alanina con una valina in posizione 222 (Frosst et al., 1995; Friso et al., 2005). I diversi genotipi del polimorfismo C677T modificano l'attività enzimatica riducendo la funzionalità dell'enzima al 65% negli eterozigoti (CT) fino al 30% nel caso di omozigoti (TT) (Bailey et al., 1999). Questa ridotta capacità catalitica porta soprattutto i soggetti con genotipo omozigote (TT) ad una condizione di iperomocisteinemia plasmatica (Jacques et al., 1996; Ulvik et al., 2007).

1.6 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del lavoro, svolto presso il laboratorio di nutrigenetica del centro di ricerca e didattica di San Benedetto del Tronto (URDIS) dell'Università di Camerino, è stato quello

di analizzare la distribuzione genotipica dei polimorfismi del trasportatore della serotonina (5HTTLPR), del gene ACE e dell'enzima MTHFR all'interno di una popolazione di individui con diagnosi di fibromialgia. Il lavoro si inserisce nell'ambito di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il dr. Spina (Laboratorio Fioroni S.r.l.) e l'associazione Fi.Mar.Onlus (rappresentata dalla presidente Antonella Moretto) che ha come principale obiettivo la valutazione di un panel di analisi strumentali da utilizzare nella diagnosi di fibromialgia.

CAPITOLO 2

2.1 RACCOLTA CAMPIONI ED ESTRAZIONE DEL DNA DA CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO

I campioni utilizzati nel presente lavoro sono stati ottenuti da 20 individui (età media 49.05 ± 9.87 anni) affetti da fibromialgia che hanno acconsentito volontariamente di partecipare allo studio. Tale popolazione è stata reclutata in collaborazione con l'associazione Fi.Mar. ONLUS che si occupa di far conoscere e riconoscere la Fibromialgia sia a livello regionale che nazionale. La diagnosi di fibromialgia è stata effettuata attraverso l'utilizzo del questionario auto-valutativo FSQ, il quale descrive e definisce i sintomi caratteristici della patologia.

I campioni di sangue periferico sono stati raccolti in provette Vacutainer® contenenti EDTA come anticoagulante secondo le normali prassi previste dal centro prelievi del laboratorio "Dr Fioroni s.r.l." di San Benedetto del Tronto (AP). Le cellule della frazione mononucleata del sangue periferico sono state isolate mediante un gradiente di densità ottenuto con il Ficoll. In breve, il sangue intero è stato diluito con una soluzione fisiologica (0,9% NaCl; 1:1 v/v) e aliquotato gradualmente al di sopra di un volume di Ficoll (HistoPaque®-1077, Sigma; 2:1 v/v) in provette da 15 ml (Falcon™). Successivamente è stata separata la frazione plasmatica da quella corpuscolata mediante una centrifuga a 1800 rpm per 15 minuti. Dopo avere recuperato il plasma e i globuli bianchi, è stata effettuata un'ulteriore centrifuga a 2800 rpm per 5 minuti. Le cellule mononucleate precipitate sono state così solubilizzate in una soluzione contenente guanidina isotiocianato (0,2 M; GITC). Il DNA è stato estratto dalle cellule con l'aggiunta di una soluzione contenente Trizol™ LS, seguendo le indicazioni della casa produttrice (Invitrogen). Infine il DNA è stato risospeso in una soluzione basica contenente NaOH (8 mM). L'integrità del DNA è stata verificata attraverso la colorazione con SafeView™ Classic (AbmGood) dopo corsa elettroforetica su gel d'agarosio (1%). La quantità e la purezza del DNA sono state verificate allo spettrofotometro leggendo le assorbanze a 260 e 280 nm.

2.2 ANALISI DEL POLIMORFISMO 5-HTTLPR MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

Il DNA purificato è stato amplificato mediante PCR utilizzando specifici primers riportati in Tabella 1. Brevemente, la migliore condizione di amplificazione è stata ottenuta in un

volume di 25 μ l, contenente i seguenti reagenti: 2 μ l di DNA, 2,5 μ l di 10X PCR Buffer (Lucigen), 1 μ l di dNTPs (2,5 mM), 1 μ l MgCl₂ (25 mM), 0,2 μ l EconoTaq® DNA polimerasi (5 U, Lucigen) 1 μ l di ciascun primer (10 μ M) e 16,3 μ l di H₂O DNase-RNase free (Fermentas). Un campione contenente tutti i reagenti della PCR, ma senza il DNA, è stato utilizzato come controllo negativo. I campioni sono stati amplificati, dopo una denaturazione iniziale a 95 °C per 3 min, utilizzando il seguente profilo termo ciclico:

1. Denaturazione: 95 °C per 30''
2. Annealing: 54 °C per 30''
3. Estensione: 72 °C per 60''
4. Estensione finale: 72°C per 3'

La reazione di amplificazione è stata condotta impostando a 40 il numero totale di cicli. I prodotti della PCR sono stati poi separati attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 3% e le immagini del gel sono state acquisite utilizzando una fotocamera digitale Cyber-Shot (Sony) (Figura 6).

2.3 ANALISI DEL POLIMORFISMO I/D (ACE) MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

In breve, 2 μ l di DNA sono stati aggiunti alla miscela di reazione contenente 12,5 μ l di 2X PCR Master Mix (Fermentas), 1 μ l di ciascun primer (10 μ M; Tabella 1) e 8,5 μ l di H₂O DNase-RNase free (Fermentas). Un campione contenente tutti i reagenti della PCR, ma senza il DNA, è stato utilizzato come controllo negativo. I campioni sono stati amplificati, dopo una denaturazione iniziale a 95°C per 7 min, utilizzando il seguente ciclo termo ciclico:

1. Denaturazione: 94°C per 30''
2. Annealing: 58°C per 45''
3. Estensione: 72°C per 45''
4. Estensione finale: 72°C per 7'

La reazione di amplificazione è stata condotta impostando a 30 il numero totale di cicli. I prodotti della PCR sono stati poi separati attraverso elettroforesi su gel di agarosio all' 1,5

% e le immagini del gel sono state acquisite utilizzando una fotocamera digitale Cyber-Shot (Sony) (Figura 6).

2.4 ANALISI DEL POLIMORFISMO C677T (MTHFR) MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

La migliore condizione di amplificazione è stata ottenuta in un volume di 25 µl, contenente i seguenti reagenti: 2 µl di DNA salivare, 12,5 µl di 2X PCR MasterMix (Fermentas), 1 µl di ciascun primer (10 µM; Tabella 1) e 8,5 µl di H₂O DNase-RNase free (Fermentas). Un campione contenente tutti i reagenti della PCR, ma senza DNA, è stato utilizzato come controllo negativo. I campioni sono stati amplificati, dopo una denaturazione iniziale di 95 °C per 5 minuti, utilizzando il seguente profilo termico:

1. Denaturazione: 94 °C per 30''
2. Annealing: 60 °C per 30''
3. Estensione: 72 °C per 60''
4. Estensione finale: 72 °C per 7'

La reazione di amplificazione è stata condotta impostando a 36 il numero totale di cicli. I prodotti della PCR sono stati poi separati su gel di agarosio al 1% per confermare la presenza del frammento amplificato (198 bp).

2.4.1 Restrizione enzimatica

Per la reazione di restrizione i prodotti di PCR sono stati sottoposti a digestione enzimatica tramite l'utilizzo dell'enzima HinfI (1 U a 37°C per 1 h; Fermentas). In breve 10 µl del prodotto di amplificazione sono stati aggiunti alla miscela di reazione contenente 2 µl di FastDigest Buffer 10X (Fermentas), 1 µl di FastDigest Enzyme (Fermentas) e 17 µl di H₂O DNase-RNase free. I prodotti finali della restrizione sono stati separati dopo una corsa su gel di agarosio al 2.5%. Le caratteristiche della reazione di digestione con l'enzima HinfI sono riportate in Figura 6.

Polimorfismo	Sequenza	Referenze
<i>5-HTTLPR</i>	5'-TGAATGCCAGCACCTAACCC-3' 5'-TTCTGGTGCCACCTAGACGC-3'	Offenbaecher et al. (1999)
<i>ACE</i>	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' 5'-GATGTGGCCATCTTCGTCAGAT-3'	Inanir et al. (2015)
<i>MTHFR (C667T)</i>	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'	Inanir et al. (2015)

Tabella 1: Lista dei primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione

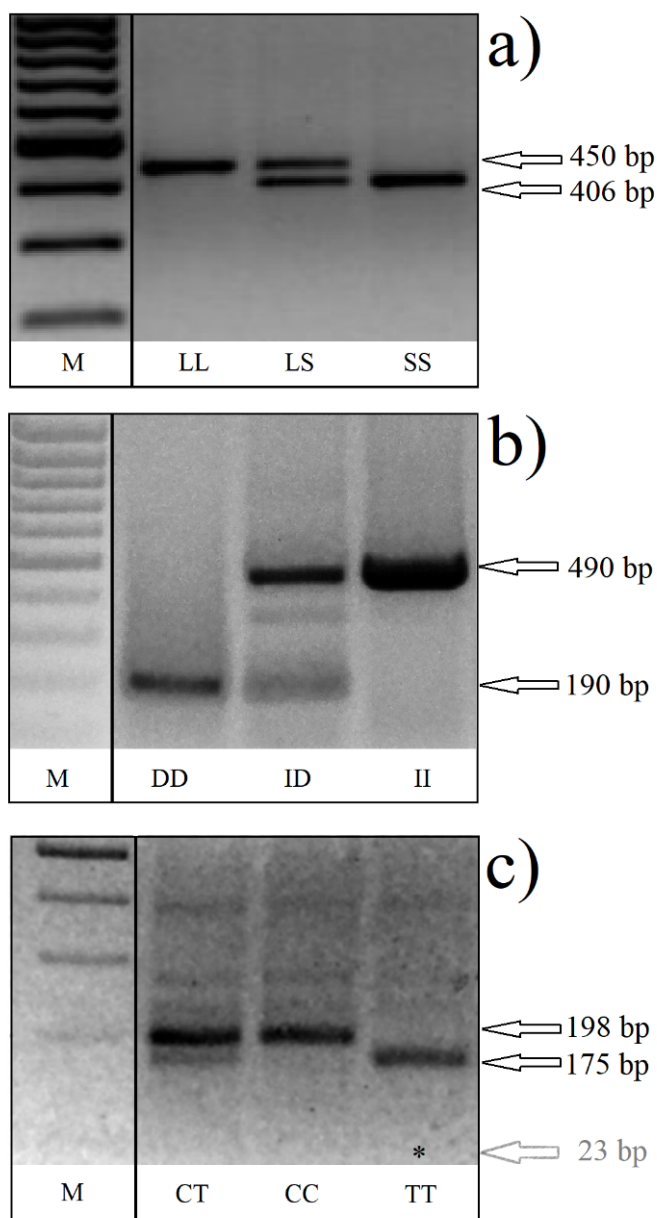


Figura 6: Visualizzazione mediante elettroforesi su gel dei diversi genotipi rappresentativi dei geni analizzati. a) *5-HTTLPR*, b) *ACE* e c) *MTHFR (C667T)*. M: marcatore di peso molecolare. LL: long/long. LS: long/short. SS: short/short. DD: delezione/delezione. ID: inserzione/delezione. II: inserzione/inserzione. CT: eterozigote. CC: omozigote wild-type. TT: omozigote mutato. * Il prodotto di 23 bp non è visualizzabile su gel di agarosio.

CAPITOLO 3

3.1 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in seguito allo screening del polimorfismo 5HTTLPR dimostrano una presenza significativa del genotipo SS nei soggetti fibromialgici rispetto alla popolazione di controllo (Tabella 2). Infatti, il gruppo sperimentale oggetto dello studio è costituito per il 75% da soggetti omozigoti SS e per il restante 25% da pazienti eterozigoti per il polimorfismo (LS).

Gruppi	Genotipo (n)			P	Allele (n)		P
	LL	LS	SS		L	S	
Fibromialgici	0	5	15	<0,0001*	5	20	0,0034*
Controllo	76	84	37		160	158	

Tabella 2: Genotipo e frequenza allelica del polimorfismo 5HTTLPR

* $P < 0,05$ utilizzando il test di Fisher rispetto al gruppo di controllo (Polito et al., 2011).

Tali distribuzioni risultano significativamente diverse rispetto a quelle riscontrate nella popolazione di controllo che, al contrario, presenta soltanto un 19% di individui omozigoti per il polimorfismo (SS). Tali dati concordano con quanto riscontrato in letteratura riguardo la potenziale correlazione tra presenza in omozigosi del polimorfismo e sindrome fibromialgica.

Come precedentemente descritto, il polimorfismo 5-HTTLPR nel gene SLC6A4 regola la trascrizione del trasportatore della serotonina e la presenza dell'allele S risulta associata ad una riduzione della trascrizione del gene. In condizioni di omozigosi per il polimorfismo (SS), la ridotta presenza del trasportatore a livello pre-sinaptico porta ad uno squilibrio dell'omeostasi relativa alla concentrazione della serotonina nella fessura sinaptica. Tale condizione sembra correlata con un generale decremento della concentrazione della serotonina e dei suoi metaboliti, sia a livello plasmatico che nel liquido cerebrospinale, come spesso osservato nei pazienti affetti da fibromialgia (Wolfe et al., 1997; Russell et al., 1992).

Il sistema serotonergico regola il sonno ed è coinvolto nell'insorgenza di alcuni sintomi psichiatrici come la depressione e l'ansia, che risultano tratti comuni dei pazienti fibromialgici (*Murphy et al., 1998*). Inoltre, alcuni studi condotti su modelli animali hanno dimostrato come la serotonina sia coinvolta nella regolazione del processo nocicettivo a livello del midollo spinale (*Sharma et al., 1990*). A tal proposito è stato suggerito che i ridotti livelli sierici di serotonina, osservabili nei fibromialgici, possano essere correlati con un'alterata percezione del dolore (*Russell et al., 1992*).

Nello stadio 4 del sonno, a livello dell'ippocampo, i livelli di serotonina plasmatica risultano essere molto elevati; di conseguenza, la riduzione della sua concentrazione nel plasma può portare a disturbi della sfera del sonno (*Wilke et al., 1985*). I disturbi del sonno comportano anche un'alterazione dei pattern di secrezione dell'ormone della crescita (GH). Il GH è un ormone essenziale per indurre il rilascio del fattore di crescita insulino simile (IGF-1) a livello epatico, il quale svolge un'importante funzione anabolica sul tessuto muscolare ed un suo deficit può portare ad una condizione di mialgia. Infatti *Bennett et al. (1992)* e *Russell et al. (1996)* hanno riscontrato una riduzione dei livelli plasmatici di IGF-1 in pazienti fibromialgici.

Un altro meccanismo responsabile della mialgia potrebbe essere legato al fatto che la serotonina normalmente inibisce la sintesi di sostanza P, coinvolta nella percezione del dolore. Infatti, la ridotta concentrazione di serotonina, normalmente riscontrata in soggetti fibromialgici, potrebbe non essere sufficiente ad inibire la sintesi di sostanza P, che tende dunque ad accumularsi a livello del liquido cerebrospinale e del tessuto muscolare (*Vaeroy et al., 1988; Russell et al., 1994*). Molti studi hanno infatti confermato un effettivo aumento della sostanza P nei pazienti con diagnosi di fibromialgia (*Bradley et al., 1996; Welin et al., 1995*). Inoltre, l'attivazione dei recettori della sostanza P (*i.e.* recettori 1 della neurochinina - NK1R) potrebbe mediare l'induzione dei neuroni del *Locus Coeruleus*, un nucleo situato nel tronco encefalico e coinvolto nelle risposte allo stress, al panico, ed al sonno REM. Questo meccanismo mette in risalto come tali recettori presentino una forte associazione con i circuiti neuronali che coordinano le risposte adattive allo stress e che quindi entrano in gioco nella regolazione dell'umore, nel comportamento emozionale e nella patogenesi dello stress (*Massoni et al., 2003*).

Il secondo polimorfismo analizzato nel presente lavoro è stato il polimorfismo I/D nel gene ACE. Tuttavia, dall'analisi delle frequenze alleliche e genotipiche non risultano presenti differenze significative rispetto alla distribuzione dei differenti genotipi all'interno della popolazione di controllo (Tabella 3).

Gruppi	Genotipo (n)			P	Allele (n)		P
	II	ID	DD		I	D	
Fibromialgici	1	14	5	0,09	16	24	0,48
Controllo	19	66	67		104	200	

Tabella 3: Genotipo e frequenza allelica del polimorfismo ACE
Gruppo di controllo (Scavanini et al., 2002).

Il terzo ed ultimo polimorfismo analizzato è stato il C677T nel gene che codifica per la MTHFR. Dall'analisi dei dati è stata osservata una diffusione maggiore del genotipo *TT* (35%) rispetto al gruppo di controllo (17%) (Tabella 4). Inoltre, l'allele *T* risulta essere maggiormente presente nei fibromialgici (85%) rispetto ai controlli (65%).

Gruppi	Genotipo (n)			P	Allele (n)		P
	CC	CT	TT		C	T	
Fibromialgici	3	10	7	0,09	16	24	0,04*
Controllo	48	69	25		165	119	

Tabella 4. Genotipo e frequenza allelica del polimorfismo MTHF-677

*P<0,05 utilizzando il test di Fisher rispetto al gruppo di controllo (Cigliero et al., 2011)

Come precedentemente descritto, la presenza del polimorfismo in eterozigosi (genotipo *CT*) è associata ad una riduzione del 35% dell'attività catalitica dell'enzima, mentre tale attività si riduce del 70% in presenza di omozigosi (genotipo *TT*) (Bailey et al., 1999). Queste condizioni comportano l'insorgenza di una più o meno marcata iperomocisteinemia plasmatica che è solitamente riscontrabile nei pazienti fibromialgici. Dati presenti in letteratura suggeriscono come elevati livelli di omocisteina possano danneggiare i recettori dell' N-Metil-D-Aspartato (NMDA) presenti sui neuroni sensitivi secondari (Stuart et al., 1997). Il recettore NMDA è un canale per i cationi, voltaggio e ligando dipendente (glicina e glutammato). In condizioni fisiologiche, all'arrivo dello stimolo da parte dei neuroni sensoriali primari, l'apertura del canale permette l'afflusso di

cationi come il sodio e il calcio. In condizioni di iperomocisteinemia, invece, l'omocisteina in eccesso può comportarsi da antagonista del recettore nel sito di legame della glicina, e da agonista nel sito di legame per il glutammato, provocando così una costante apertura del canale con continuo afflusso di cationi nella cellula (soprattutto calcio). Tale processo provoca l'attivazione delle lipasi e fosfolipasi calcio-dipendenti, portando alla formazione di radicali liberi e quindi a morte cellulare. L'attivazione costante di questi recettori comporta un persistente stato di eccitazione neuronale, fenomeno noto come "Wind Up", connettendo dunque l'informazione dolorifica ai centri superiori ed amplificando la sensazione di dolore (*Conti et al., 2005*). L'attivazione di questo meccanismo potrebbe spiegare, almeno in parte, la correlazione tra sindrome fibromialgica e polimorfismo MTHFR.

BIBLIOGRAFIA

- Abeles AM, Pillinger MH, Solitar BM, Abeles M. Narrative review: the pathophysiology of fibromyalgia. *Ann Intern Med.* 2007;146:726–734
- Arnold LM, Fan J, Russell IJ, et al. The fibromyalgia family study: a genome-wide linkage scan study. *Arthritis Rheum.* 2013;65:1122–1128
- Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requiremen. *J Nutr.* 1999 May; 129(5):919-22
- Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE and Blonna D. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Pain Res Treat.* 2012; 2012: 426130
- Bennett RM, Clark SR, Campbell SM, et al. Low levels of somatomedin-C in patients with fibromyalgia syndrome *Arthritis Rheum* 1992;35:1113-1116
- Bennett RM, Friend R, Jones KD, Ward R, Han BK, Ross RL. The Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR): validation and psychometric properties. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R120
- Bigatti SM, Hernandez AM, Cronan TA et al. (2008). Sleep disturbances in fibromyalgia syndrome: relationship to pain and depression. *Arthritis Rheum* 59: 961–967.
- Bradley LA, Alberts KR, Alarcon GS. Abnormal brain regional cerebral blood flow (rCBF) and cerebrospinal fluid (CSF) levels of substance P (SP) in patients and non-patients with fibromyalgia (FM). *Arthritis Rheum [abstract]* 1996; 39: 212
- Buskila D, Sarzi-Puttini P. Biology and therapy of fibromyalgia. Genetic aspects of fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:218
- Cigliero SS, Fabiani C, Boccato CM, Moratti M, Procopio M and Fattorini P. C667T mutation in MTHFR: population data in Friuli-Venezia Giulia (North-East Italy). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series. Volume 3, Issue 1, December 2011, Pages e295-e296*
- Conti F. *Fisiologia Medica.* 2005 Edi Ermes
- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J.* 1993; 290: 33–40
- Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation.* 1995; 92: 1387–1388
- Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest.* 1987; 56: 345–348
- Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr Drug Metab.* 2005 Feb; 6(1):37-46
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May; 10(1):111
- Heils A, Teufel A, Petri S., et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 1996; 66: 2621–2624.
- Holman AJ (2008). Pragmatic consideration of recent randomized, placebo-controlled clinical trials for treatment of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep* 12: 393–398.
- Inanir A, Yigit S, Tekcan A, Pinarli FA, Inanir S, Karakus N. Angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase gene variations in fibromyalgia syndrome. *Gene.* 2015 Jun 15;564(2):188-92. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.051. Epub 2015 Mar 28
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996 Jan 1; 93(1):7-9
- Jain AK, Carruthers BM, van de Sande MI et al. (2003). Fibromyalgia syndrome: Canadian clinical working case definition, diagnostic and treatment protocols – a consensus document. *J Musculoskelet Pain* 11: 3–107.
- Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). *Studies with bradykinin and other natural peptides.* *J Biol Chem.* 1993; 268: 9496–9503
- Junhua L and Feng L. The Role of Serotonin beyond the Central Nervous System during Embryogenesis. *Cell. Neurosci.,* 13 March 2017
- Leclerc D, Rozen R. Molecular genetics of MTHFR: polymorphisms are not all benign. *Med Sci (Paris).* 2007 Mar; 23(3):297-302
- Lentz MJ, Landis CA, Rothermel J et al. (1999). Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women. *J Rheumatol* 26: 1586–1592.
- Lesch KP, Wolozin BL, Estler HC, Murphy DL, Riederer P. Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 91: 67–72.
- Lurescia S, Seripa D, Rinaldi M. Looking Beyond the 5-HTTLPR Polymorphism: Genetic and Epigenetic Layers of Regulation Affecting the Serotonin Transporter Gene Expression. *Mol Neurobiol.* 2017 Dec;54(10):8386-8403. doi: 10.1007/s12035-016-0304-6. Epub 2016 Dec 8.
- Maletic V, Raison CL. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:5291–5338
- Massoni and Bersani. 2003. Possibile ruolo della sostanza P e del suo recettore NK 1 nei disturbi dell'umore ed in altre condizioni psichiatriche
- Mease P (2005). Fibromyalgia syndrome: review of clinical presentation, pathogenesis, outcome measures, and treatment. *J Rheumatol* 32 (Suppl 75): 6–21.
- Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Li Q, Tohda M, Greenberg B. Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *J Clin Psychiatry.* 1998;59 Suppl 15:4–12
- Offenbaecher M, Bondy B, de Jonge S, Glatzeder K, Krüger M, Schoeps P, Ackenheil M. Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis Rheum.* 1999 Nov;42(11):2482-8
- Oliveira CE, Oda JM, Ariza CB, Guembarovski RL, Hirata BK, de Almeida FC, André ND, Fungaro MH and Watanabe MA. Genetic Polymorphism in the Promoter Region of Serotonin Transporter: Implications for Ethanol Abuse in Children and Adolescents. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2016 Winter;25(1):43-9. Epub 2016 Feb 1
- Polito et al 2011. A Novel Study and Meta-Analysis of the Genetic Variation of the Serotonin Transporter Promoter in the Italian Population Do Not Support a Large Effect on Alzheimer's Disease Risk
- Rhoades R and Pflanzner R. *Fisiologia Generale e Umana.* Piccin. 2003

- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1343–1346
- Russell IJ, Michalek JE, Vipraio GA, Fletcher EM, Javors MA, Bowden CA. Platelet 3H- imipramine uptake receptor density and serum serotonin levels in patients with fibromyalgia/fibrositis syndrome. *J Rheumatol.* 1992;19:104–109
- Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992;35:550–556
- Russell IJ, Orr MD, Littman B, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arth Rheum* 1994;37:1593-1601
- Russell IJ. The neurochemical pathogenesis of fibromyalgia syndrome. *J Musculoskeletal Pain* 1996;4:61-92
- Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, Van Duijn CM, Wittman JCM. ACE Polymorphisms. *Circulation Research.* 2006;98:1123-1133
- Scanavini D, Bernardi F, Castoldi E, Conconi F and Mazzoni G. Increased frequency of the homozygous II ACE genotype in Italian Olympic endurance athletes. *Eur J Hum Genet* 10: 576–577, 2002.
- Sharma HS, Nyberg F, Olsson Y, Dey PK. Alteration of substance P after trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat. *Neuroscience* 1990;38:205-212
- Siliprandi N and Tettamanti G. *Biochimica medica. Strutturale, metabolica e funzionale.* Piccin. 2011
- Snijdelaar DG, Dirksen R, Slappendel R, Crul BJP. Substance P. *European Journal of Pain.* 2000;4(2):121–135
- Sommer C, Häuser W, Burgmer M, Engelhardt R, Gerhold K, Petzke F, et al. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Etiology and pathophysiology of fibromyalgia syndrome. *Schmerz.* 2012;26:259–267
- Starz TW, Vogt MT (2008). Fibromyalgia – it's not all in my head. *Pain Pract* 18: 62–70.
- Staud R (2009). Chronic widespread pain and fibromyalgia: two sides of the same coin? *Curr Rheumatol Rep* 11: 433–436.
- Stephan Moll, Elizabeth A. Varga. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation.* July 7, 2015, Volume 132, Issue 1
- Stuart A, Lipton, Won-Ki Kim, Yun-Beom Choi, Shanta Kumar, Danielle M. D'Emilia, Posina V. Rayudu, Derrick R. Arnette, and Jonathan S. Stamler. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27; 94(11): 5923–5928. *Neurobiology*
- Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, Schneede J. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C & T and 1298A & C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet.* 2007 Mar; 121(1):57-64
- Vaeroy H, Helle R, Forre O, et al. Elevated CSF levels of substance P and high incidence of Raynaud phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis. *Pain* 1988;32:21-26
- Watanabe MA, Nunes SO, Amarante MK, Guembarovski RL, Oda JM, Lima KW, Fungaro MH. Genetic polymorphism of serotonin transporter 5-HTTLPR: involvement in smoking behavior. *J Genet.* 2011 Apr;90(1):179-85
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M and Losick R. *Biologia molecolare del gene.* Zanichelli. 2015
- Watson NF, Buchwald D, Goldberg J, Noonan C, Ellenbogen RG. Neurologic signs and symptoms in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2009 Sep;60(9):2839-44. doi: 10.1002/art.24772
- Wilke WS, MacKensie AH. Proposed pathogenesis of fibrositis. *Cleve Clin Q* 1985;52:147-154
- Welin M, Bragee B, Nyberg F, Kristiansson M. Elevated substance P levels are contrasted by a decrease in met-enkephalin-ARG-PHE levels in CSF from fibromyalgia patients. *J Musculoske Pain* 1995; 3: 4.
- Wolfe F, Russell IJ, Vipraio G, Ross K, Anderson J. Serotonin levels, pain threshold, and fibromyalgia symptoms in the general population. *J Rheumatol.* 1997;24:555–559
- Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62:600–610
- Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, Clark P, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990 Feb;33(2):160-72
- Yokosawa H, Endo S, Ogura Y, Ishii S. A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; 116: 735–742

RINGRAZIAMENTI

Sembra strano, eppure sono arrivato alla fine di questo percorso universitario. Se tre anni fa mi avessero detto che sarei diventato un Biologo di certo non ci avrei creduto, ma adesso sono qui con una corona di alloro in testa. Il destino, se esiste, mi ha portato fino a qui.. un susseguirsi di scelte corrette, come in un algoritmo perfetto, ha fatto in modo che io sia quello che sono oggi. C'è chi crede in un destino predeterminato, io credo in un destino fatto di scelte spesso influenzate dalle persone che ci sono vicine. Ed è in questo ultimo capitolo che volevo porre i miei ringraziamenti a loro, senza i quali non sarei arrivato a destinazione.

Grazie alla mia famiglia e soprattutto a mia Madre e a mio Padre, che crescendo mi hanno reso quello che sono e che mi hanno sostenuto in tutto e per tutto in questi tre anni.

Grazie alla mia fidanzata che mi ha spesso supportato e sopportato nei lunghi periodi di studio, venendomi a trovare nonostante i molti chilometri che ci separavano.

Grazie al mio collega e amico Alex che mi ha spinto a iniziare insieme a lui questo percorso universitario, se non lo avessi conosciuto non avrei potuto scommettere in tutto questo.

Grazie a mia Zia Silvia per le tante preghiere fatte durante i lunghi viaggi verso l'università.. Alla fine Zia sono diventato Dottore!

Grazie al mio relatore e al mio tutor aziendale che mi hanno fatto conoscere il mondo della ricerca in ambito genetico e che mi hanno aiutato in questo progetto.

Grazie a tutti i professori che mi hanno fatto appassionare ancor di più alla scienza della vita.

Grazie anche a tutte le persone non citate, che sicuramente hanno contribuito in questo percorso.

E come ogni cosa nella mia vita anche ora mi rendo conto che questa è solo una breve fermata, in attesa del prossimo treno che insieme alle persone più care mi porterà alla successiva destinazione.

Giacomo Giuliani