



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca  
in  
Genetica e Medicina Molecolare  
XXI Ciclo**

**ANALISI DI FATTORI GENETICI NELLA MODULAZIONE  
DEL DOLORE IN PAZIENTI AFFETTI DA DISFUNZIONE  
TEMPORO-MANDIBOLARE**

Docente Tutor  
Prof. Lucia Sacchetti

Dottorando  
Mario Toriello

# INDICE

1. Introduzione	2-23
2. Scopo	24
3. Materiali e Metodi	25-32
4. Risultati	33-42
5. Discussione	43-49
6. Bibliografia	50-55
7. Figure	56-59
8. Tabelle	60-67
9. Ringraziamenti	68

## INTRODUZIONE

L'Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore (1) definisce il dolore: "Una sgradevole esperienza sensoriale ed emotiva, associata ad un effettivo o potenziale danno tissutale o comunque descritta come tale. Il dolore è sempre un'esperienza soggettiva. Ogni individuo apprende il significato di tale parola attraverso le esperienze correlate ad una lesione durante i primi anni di vita. Sicuramente si accompagna ad una componente somatica, ma ha anche carattere spiacevole, e perciò, ad una carica emozionale".

La sensazione dolorosa è evocata da stimoli meccanici, termici, elettrici, chimici, luminosi che siano capaci, anche solo potenzialmente, di recare danno all'organismo e di produrre dolore. Le vie nervose e biochimiche attivate dalla sensazione dolorosa creano una serie di risposte molto complesse e articolate che coinvolgono il sistema endocrino e il sistema immunitario. L'apparato neuronale di trasmissione del dolore è essenzialmente rappresentato da:

- fibre afferenti primarie,
- vie spino-talamiche,
- talamo,
- vie talamo-corticali,
- vie talamo-limbiche.

Il dolore si produce attraverso la stimolazione di particolari tipi di recettori, i nocicettori, localizzati principalmente nella cute e nei tessuti profondi ad eccezione del tessuto nervoso cerebro-spinale. L'impulso nocicettivo che insorge nel nocicettore si propaga lungo l'assone, che rappresenta la fibra afferente primaria. I tipi di fibre interessate alla trasmissione nel primo neurone sono di due tipi: A-delta e C.

Le fibre A delta (fibre mielinizzate a maggior velocità di conduzione) conducono il primo dolore mentre le fibre C più sottili, non mielinizzate ed a più lenta velocità di conduzione conducono il secondo dolore entrando nel midollo dalle radici posteriori, e raggiungendo il corno posteriore del midollo spinale dove si distribuiscono secondo una strategia funzionale ben precisa. Qui entrano in connessione direttamente, o indirettamente, mediante brevi interneuroni, con le cellule di origine del neurone spinotalamico. Dalla cellula di origine midollare si diparte un secondo assone che sale e raggiunge i nuclei del talamo. Altre fibre invece non attraversano il midollo e salgono direttamente dallo stesso lato in cui si trova la cellula d'origine. Il talamo è una formazione ovoidale che risiede alla base del cervello in entrambi gli emisferi, e' costituito da 13 nuclei suddivisi: nuclei reticolari, nuclei anteriori, nuclei mediani, nuclei laterali, nuclei posteriori. Interessati al dolore sono i nuclei laterali, posteriori e mediani. L'importanza del talamo deriva dal fatto che esso è il "relais" delle vie sensoriali (udito, vista, tatto, dolore ecc.) che raggiungono il cervello per essere

percepiti. Senza il talamo il nostro cervello sarebbe isolato completamente dal mondo che ci circonda e non avremmo percezioni. Dal talamo gli impulsi nocicettivi sono inviati al cervello, alcuni alla corteccia somestesica primaria che crea la base della sensazione. Altri impulsi nocicettivi sono dal talamo trasmessi al sistema limbico dove la sensazione confrontata con i ricordi (inconsci), influisce sul comportamento e sull'umore, tuttavia il sistema limbico influenza anche la percezione cosciente del dolore e viceversa. Infine queste vie si dirigono direttamente alla corteccia dei lobi frontali e parietali. Le vie talamo-corticali e talamo–limbiche costituiscono l'ultimo tratto della nocicezione prima che questa diventi percezione dolorosa assumendo sfumature comportamentali legate alla personalità.

Il dolore, in generale, può avere caratteristiche di tipo acuto e cronico. Il dolore acuto è finalizzato ad allertare il corpo sulla presenza di stimoli pericolosi o potenzialmente tali nell'ambiente o nell'organismo stesso, quindi è un dolore “utile”, che prima di essere affrontato e trattato va capito, interpretato e inserito nel corretto nesso eziopatogenetico per un'adeguata, quando possibile, terapia della patologia causale.

Il dolore cronico deve essere considerato in modo diverso:

- se la condizione patologica che provoca il dolore è nota e in buona parte non aggredibile,
- se il dolore è persistente nel tempo,

- se la sua presenza continua instaura un circolo vizioso di depressione, ansia e altri disturbi emotivi, e il dolore diviene sindrome autonoma con pesante impatto sulla vita di relazione e sugli aspetti psicologici e sociali caratteristici della persona.

Allora il dolore diviene un sintomo “inutile” e va trattato nel modo più tempestivo e completo possibile.

In questo senso, il dolore cronico non rappresenta solo una estensione temporale del dolore acuto, ma assume caratteristiche qualitative completamente diverse, che necessitano di un approccio mentale, culturale e professionale opposto.

In particolare, il dolore cronico presente nelle malattie degenerative, neurologiche, oncologiche, specie nelle fasi avanzate e terminali di malattia, assume caratteristiche di dolore Globale, legato a motivazioni fisiche, psicologiche e sociali, come evidenziato nei documenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (2) .

I meccanismi attraverso cui insorge il dolore, ovvero la fisiopatologia del dolore sono complessi e variabili.

Diverse sono le cause (malattia, terapia), i tessuti (spesso più di uno e in modo dinamico e progressivo nel tempo), i meccanismi, le vie, i neurotrasmettitori ed i recettori coinvolti.

Il dolore cronico (specie se oncologico) è misto in quanto vengono stimolati tutti e tre i maggiori meccanismi fisiopatogenetici del dolore: nocicettivo, neuropatico ed idiopatico.

- nocicettivo: come visto in precedenza, è il dolore "fisiologico". I nocicettori, terminazioni nervose periferiche appositamente e finalisticamente dedicate alla rilevazione di insulti e di danni tissutali, presenti in strutture somatiche o viscerali, vengono attivati e trasmettono l'impulso alle strutture centrali. L'integrazione, a vari livelli, della nocicezione e la percezione finale da parte del Sistema Nervoso Centrale costituiscono il dolore accusato dal paziente. In genere esso è correlato con l'entità del danno tissutale.

- neuropatico: è caratterizzato da danno o disfunzione del tessuto nervoso periferico o centrale, che provoca stimolazioni nervose, croniche che si esplicano in alterazioni della risposta dei neuroni del sistema somato-sensoriale centrale o periferico.

- idiopatico: il dolore idiopatico è un dolore la cui origine non è conosciuta. Per estensione, si può considerare un dolore il cui livello di intensità riportata dal paziente non abbia una corrispondente immediata motivazione organica.

## DISORDINI TEMPOROMANDIBOLARI

Un tipo di dolore cronico è osservato nei disordini temporomandibolari. I disordini temporomandibolari rappresentano un gruppo di patologie ancora poco conosciute il cui numero e gravità sono aumentati negli ultimi anni. Il dolore

oro-facciale normalmente è associato con una vasta pletera di disturbi, perdita o aumento del peso, gonfiore, perdita della libido, disturbi del sonno, deficit di attenzione (3).

Recenti studi epidemiologici indicano che il 50-60% della popolazione presenta segni di e/o marcata alterazione funzionale del sistema masticatorio mentre il 8-15% delle donne e il 3-10% dei maschi presenta una sintomatologia sufficientemente grave da richiedere un trattamento (4).

Nel tempo le diverse alterazioni del sistema masticatorio sono state identificate con una grande varietà di termini. Attualmente è generalmente accettato il termine di temporo mandibular disorders (TMD) che include in sé tutte le alterazioni connesse alla funzione del sistema masticatorio. Generalmente è accertato che l'eziologia è molto spesso multifattoriale con diversi fattori predisponenti. La causa non è sempre di facile individuazione essendo sovente legata a fattori ambientali o abitudini di vita errate. Attualmente non ci sono evidenze scientifiche che avvalorino l'ipotesi che queste condizioni siano sempre progressive mentre appare statisticamente ben dimostrato che spesso si ha la persistenza della sintomatologia senza o nonostante la terapia (5).



## CLASSIFICAZIONE

Bell (6) propose per primo una classificazione logica dei TMD. Nel 1992 l'American Academy of Orofacial Pain (7) con la collaborazione dell'International Headache Society (8) modificò la classificazione di Bell suddividendo i TMD in tre categorie, ciascuna divisa in diversi quadri clinici.

### 1. ALTERAZIONE DEI MUSCOLI MASTICATORI

I disordini dei muscoli masticatori sono simili a quelli che possono presentarsi in qualsiasi altro muscolo del corpo. Il sintomo principale è il dolore che si presenta durante la funzione e che si aggrava con la palpazione e con la manipolazione funzionale dei muscoli. Si ha limitazione dei movimenti mandibolari e a volte malocclusione acuta. Tra le alterazioni dei muscoli masticatori possiamo avere diversi quadri clinici, tra cui:

#### 1.1 CO-CONTRAZIONE PROTETTIVA

Si manifesta quando per una reazione protettiva verso una zona lesa o per un aumento dello stress emotivo si ha un' aumentata attività del muscolo antagonista durante la contrazione dell'agonista. Si manifesta con: limitazione della velocità e dell'estensione del movimento, rigidità alla manipolazione, dolore durante la funzione ma non a riposo.

## 1.2 DOLORE MIOFASCIALE

Dolore caratterizzato dalla presenza dei punti “grilletto” che sono delle aree ipersensibili situate nei muscoli che, se stimolate dalla pressione producono dolore loco-regionale con irradiazione a distanza e possibili reazioni di tipo neurovegetativo. Il dolore è spesso presente anche quando i muscoli sono a riposo manifestandosi come cefalea tensiva ed aumentando di intensità durante la funzione del muscolo interessato.

## 1.3 MIOSPASMO

Improvvisa e involontaria contrazione tonica che causa l'improvviso accorciamento di un muscolo. Si manifesta con: dolore acuto a riposo che aumenta durante la funzione, notevole limitazione del movimento.

## 1.4 MIOSITE

Risposta infiammatoria del tessuto muscolare ad un insulto infettivo o alla presenza di cataboliti accumulatisi per il persistere nel tempo di un'alterazione della muscolatura masticatoria. Si ha: dolore cronico e costante a riposo che aumenta con la funzione e con la palpazione, limitazione dei movimenti mandibolari e successivamente contrattura con limitazione dell'apertura della bocca.

## 1.5 CONTRATTURA

Accorciamento cronico di un muscolo come risultato di una fibrosi della fascia, dei tendini, o delle fibre muscolari. Clinicamente si presenta con limitazione dell'apertura della bocca senza la presenza di dolore e resistenza all'apertura passiva.

## 2. PATOLOGIE DELL'ARTICOLAZIONE TEMPORO- MANDIBOLARE

I sintomi principali della patologia articolare sono correlati con la funzione associata all'alterazione dei movimenti condilari, mentre il dolore non sempre è presente. Il paziente riferisce una sensazione di scatto o di blocco articolare durante i movimenti mandibolari, i sintomi sono spesso progressivi e riproducibili dall'operatore durante l' esame clinico. Tra i diversi quadri clinici ricordiamo:

### 2.1 DISLOCAZIONE

Questa disfunzione articolare nota anche come blocco aperto (open-lock) o lussazione, è caratterizzata dal superamento dell'eminenza articolare da parte del complesso condilo-disco durante il movimento d'apertura mandibolare con l'impossibilità di ritornare nella posizione di chiusura. Nella dislocazione mandibolare il paziente rimane bloccato in massima apertura e non è in grado di ristabilire i normali rapporti articolari (lussazione) perché il disco rimane intrappolato davanti al condilo bloccandolo oltre l'eminenza.

### 2.2 INFIAMMAZIONE

Le infiammazioni dell'ATM sono secondarie a trauma, irritazione o infezione e spesso accompagnano altre patologie articolari. Sono caratterizzate da dolore locale a riposo esacerbato dalla funzione e alla palpazione, riduzione dei movimenti articolari per la presenza di dolore.

3.MALATTIE DELLE OSSA CRANIALI E DELLA MANDIBOLA si dividono in:

3.1 DISORDINI CONGENITI E DELLA CRESCITA come:

3.1.1 APLASIA: Quasi tutte le aplasie della mandibola appartengono al gruppo di anomalie comunemente conosciute come microsomia emifacciale o sindrome del primo o secondo arco branchiale. Estremamente rara è l'assenza congenita (agenesia) della mandibola o della mascella.

3.1.2 IPOPLASIA: Lo sviluppo è considerato normale sebbene proporzionalmente ridotto

3.1.3 IPERPLASIA: Incremento non neoplastico del numero di cellule normali che si presenta come un ingrandimento localizzato.

3.1.4 DISPLASIA: Tumefazione benigna a lenta crescita della mandibola e/o della mascella caratterizzata dalla presenza di tessuto connettivo fibroso.

3.1 DISORDINI ACQUISITI

3.2.1 NEOPLASIA: Crescita anormale ed incontrollata delle ossa craniali o mandibolari che può essere di natura benigna (osteoma, condrioma etc)

3.1.2 FRATTURE: I traumi possono interessare tutte le ossa dell'apparato stomatognatico (temporale, mascella, zigomo etc) e provocare fratture, dislocazioni, contusioni e lacerazioni delle superfici articolari.

## COMT E TMD

Nel 1976 Marbach e Levitt (9) riportarono che pazienti con dolore miofacciale persistente mostravano un incremento dei livelli urinari di catecolammine ed esprimevano una riduzione dell'attività di COMT. Tale dato suggerì un ruolo di COMT in questa persistente condizione patologica, dato supportato dalla sempre più crescente convinzione che il dolore sia un'esperienza complessa che comprende elementi sensitivi affettivi e cognitivi, evidenze suggeriscono che la sensibilità al dolore individuale è influenzata anche da fattori genetici (10,11)

Il gene COMT mappa sul braccio lungo del cromosoma 22 in prossimità del gene BCR, è costituito da 27.284 basi e codifica per una proteina di 271 aminoacidi (a.a.) e del peso di 30 kDa (12). COMT è costituito da 6 esoni. I primi 2 esoni sono trascritti ma non tradotti. L'esone 6 contiene il codone di termine della traduzione in posizione +814, inoltre è presente un putativo segnale di poliadenilazione (AATTAA) in posizione +1082 (12).

L'enzima COMT è presente in due forme, una solubile, S-COMT di 1,3 kb ed una di membrana, MB-COMT di 1,5 kb. Le sequenze polipeptidiche di S-COMT, costituita da 221 aminoacidi, 25kDa e di MB-COMT di 50 kDa sono

parzialmente identiche, tranne che per una coda N-terminale composta da 50 aminoacidi presente in MB-COMT ed assente nella forma solubile .

La trascrizione di MB-COMT è sotto il controllo di un promotore denominato P2, mentre il promotore P1 controlla la trascrizione di S-COMT (13) fig.1. Il gene COMT codifica l'enzima citosolico catecol-O-metiltransferasi che catalizza il trasferimento di un gruppo metile dalla S-adenosilmetionina alla catecolammina. La catecol-O-metiltransferasi è implicata nel metabolismo di alcuni farmaci, e nell'inattivazione e la biotrasformazione delle catecolammine endogene ed esogene agendo, quindi, come modulatore di neurotrasmettitori quali l'adrenalina, la noradrenalina e la dopamina. Gli ormoni catecolamminergici vengono sintetizzati nelle cellule cromaffini della midollare del surrene attraverso una serie di reazioni enzimatiche. Nel citoplasma di queste cellule, ad opera della tirosina idrossilasi, la tirosina è convertita in diidrossifenilalanina (DOPA), la quale diviene substrato di un altro enzima, aminoacido aromatico decarbossilasi, che utilizza come cofattore il piridossal fosfato determinando la dopamina. La dopamina così formata nel citoplasma deve essere captata dai granuli cromaffini prima di essere ulteriormente modificata. Successivamente un enzima, la dopamina beta idrossilasi, presente esclusivamente nei granuli, in presenza di ossigeno molecolare e di un donatore di idrogeno catalizza la sintesi di noradrenalina a partire dalla dopamina. Nel 15% dei granuli, la sequenza termina a questo punto e viene quindi accumulata noradrenalina. Nel restante

85% dei granuli, la noradrenalina diffonde di nuovo nel citoplasma, dove viene metilata dalla Feniletanolamina N-metiltransferasi, che utilizza S-adenosilmetionina come donatore di metili. L'adrenalina che ne risulta torna nuovamente nei granuli cromaffini, dove viene accumulata come principale ormone della midollare del surrene. Una serie di stimoli quali il dolore, la percezione di un pericolo, i traumi, l'ipotensione, temperature troppo basse o troppo alte, l'ipoglicemia, l'intenso sforzo fisico etc, vengono avvertiti a vari livelli dei centri superiori del sistema nervoso simpatico e risposte vengono attivate nell'ipotalamo e nel tronco encefalo. In seguito alla stimolazione delle fibre pregangliari colinergiche si libera acetilcolina causando la depolarizzazione delle cellule cromaffini aumentandone la permeabilità al sodio. La depolarizzazione, a sua volta, provoca l'influsso di ioni calcio nella cellula e questo evento stimola l'esocitosi dei granuli secretori.

Gran parte dell'adrenalina e noradrenalina viene metabolizzata all'interno delle stesse cellule cromaffini della midollare del surrene, quando la sintesi supera la capacità di accumulo. L'adrenalina e la noradrenalina circolanti vengono catabolizzate in molti tessuti ma soprattutto nel fegato e nel rene. Gli ormoni catecolamminergici vengono metabolizzati da una serie di enzimi chiave tra cui COMT e la combinazione tra monoamina ossidasi e aldeide ossidasi. La O-metilazione indotta da COMT è responsabile della produzione ed escrezione di metanefrina (originata dall'adrenalina) e di normetanefrina (originata dalla

noradrenalina). L'adrenalina e la noradrenalina esplicano i loro effetti tramite recettori presenti sulla membrana delle cellule bersaglio, che sono denominati  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ . L'adrenalina tende ad agire più intensamente con i recettori di tipo beta, mentre la noradrenalina con i recettori di tipo alfa. Gli effetti indotti da questi ormoni catecolaminergici sono molteplici: aumento della glicogenolisi, aumento della gluconeogenesi, della lipolisi, della termogenesi, della contrattilità cardiaca, della velocità di conduzione, della dilatazione atriale etc.

Un sostanziale aumento delle catecolammine è stato associato ad una condizione di dolore cronico, come ad esempio ad una condizione persistente di dolore miofasciale. Soggetti affetti da fibromialgia presentano livelli aumentati di noradrenalina; ed è stato dimostrato che il sistema adrenergico contribuisce alla patogenesi dell'artrite reumatoide in ratti (14).

L'aumento della concentrazione di catecolammine circolanti è associato alla diminuzione dell'attività di COMT, con un aumento della sensibilità al dolore e a patologie quali la fibromialgia e a disordini temporomandibolari (15).

Per caratterizzare gli elevati livelli di catecolammine, risultanti da una riduzione dell'attività di COMT inducendo un aumento della sensibilità al dolore, si sono somministrati inibitori di COMT in ratti e si sono valutate le risposte ad una serie di stimoli applicati, tali animali presentavano una allodinia tattile e iperalgesia. Per capire quali classi di recettori mediassero l'incremento della sensibilità al



dolore COMT- dipendente si sono somministrati a gruppi di ratti, antagonisti del recettore  $\alpha$ , antagonisti del recettore  $\beta$  e del recettore D. Tali esperimenti hanno dimostrato che le catecolammine attivavano i recettori  $\beta$  2 localizzati sulle afferenze nocicettive e producono iperalgesia nei ratti. Tali dati suggeriscono che l'alterazione della sensibilità al dolore COMT-dipendente e la risposta agli oppioidi è collegata anche alla stimolazione dei recettori beta 2 adrenergici. Anche i recettori  $\beta$  3 mediano lo sviluppo di dolore in quanto sono molto abili a regolare la noradrenalina. E' stato osservato che sopprimendo i recettori  $\beta$  2, 3 adrenergici si attenua il dolore per riduzione dell'attivazione delle catecolammine. Quindi gli inibitori di COMT e gli elevati livelli di catecolammine risultanti da tale riduzione enzimatica producono un innalzamento della sensibilità al dolore attraverso i recettori  $\beta$  2 e  $\beta$  3. Venne suggerito inoltre che antagonisti di tali recettori possono dare beneficio a pazienti con dolore persistente caratterizzati da elevati livelli di catecolammine o/e riduzione dell'attività di COMT (16).

Risposte al dolore e verso altri agenti inducenti stress sono regolati da interazioni tra aree diverse del cervello. Zubieta et al (17) hanno esaminato l'influenza di un polimorfismo genetico funzionale che agisce sul metabolismo delle catecolammine correlato alla modulazione delle risposte al dolore continuo nell'uomo. Soggetti omozigoti per l'allele met158 del polimorfismo 158val>met di COMT mostrano un'attività diminuita del sistema mu-opioide paragonato a quello dei soggetti

eterozigoti. Il polimorfismo 158val>met di COMT regola in tal modo l'esperienza umana del dolore e può essere posto alla base delle differenze interindividuali nell'adattamento alle risposte al dolore e ad altri stimoli inducenti stress. Gli autori hanno proposto che il polimorfismo 158val>met influenzi la diversa sensibilità al dolore indirettamente attraverso la regolazione dei recettori oppioidi; questo studio ha suggerito che riduzioni dell'attività enzimatica di COMT, associate alla presenza dell'aminoacido met al posto della valina, determina un aumento delle quantità di dopamina che porta ad una deplezione delle encefaline attraverso la stimolazione dei recettori DA2 localizzati sui neuroni encefalici.

Il gene COMT ed in particolare l'SNP 158val>met sono fortemente implicati nella patogenesi di numerosi disordini neuropsichiatrici, nell'emicrania (18), nella malattia di Parkinson (19.), nella suscettibilità all'insorgenza della schizofrenia (20), grazie al suo ruolo nel metabolismo della dopamina e alla localizzazione genica all'interno della regione assente nei soggetti affetti da sindrome velocardiofaciale (21), una patologia strettamente correlata alla schizofrenia . Il gene COMT gioca un ruolo importante nella eziopatologia dei disordini ossessivo-compulsivi (22), degli attacchi di panico (23), dei disordini da deficit dell'attenzione e iperattività (24)., dell'anoressia nervosa (25), della ansietà fobica (26), dei disordini bipolari (27). E' stato osservato che la metilazione dei promotori di COMT in isole CpG ne determina l'inattivazione, questo fenomeno è stato

associato alla carcinogenesi endometriale, in quanto i catecol-estrogeni possono essere ossidati e dare luogo a specie reattive che reagiscono con il DNA per formare “depurinating adducts”, molecole che potrebbero svolgere un ruolo importante nella genesi tumorale (28).

Recentemente è stato dimostrato che il gene COMT gioca un ruolo primario nella regolazione individuale della percezione del dolore e nello sviluppo di patologie temporomandibolari (29). Inoltre in un lavoro pubblicato su “Human Molecular Genetics” del 2005 (30) si esaminò la relazione tra polimorfismi di COMT, sensibilità al dolore e il rischio di sviluppare patologie temporomandibolari (TMD). In questo studio vennero arruolate donne sane statunitensi a cui venne indotto il dolore attraverso stimolazione termica e meccanica. In funzione della risposta individuale a stimoli dolorosi, la popolazione venne suddivisa in tre gruppi: LPS (low pain sensitivity), APS (average pain sensitivity) e HPS (high pain sensitivity). Obiettivo degli autori era riuscire a correlare varianti geniche del gene COMT con le differenti risposte al dolore. Il gene COMT venne analizzato considerando solo 6 polimorfismi.

Il primo SNP (rs 2097903) è presente in posizione -1217 ed è localizzato in P2. Il secondo SNP (rs6269) localizzato nel promotore P1, mentre nella regione codificante di S-COMT e MB-COMT vi erano i successivi tre polimorfismi (rs4633, rs4818, rs4680) di cui il terzo e il quarto sinonimi, mentre il quinto invece non sinonimo. Rs4680 codifica per una sostituzione valina/metionina nel

codone 158. Il sesto polimorfismo invece è situato nella regione 3' UTR. L'analisi degli aplotipi ha mostrato che rs 4680, 4633, 4818 e 6269 sono SNPs che viaggiano assieme avendo un elevato valore di  $D1$  e  $R^2$ . Gli autori hanno quindi considerato solo i 4 polimorfismi succitati; andando ad individuare tre combinazioni alleliche (aplotipi) maggiormente frequenti nella popolazione oggetto dello studio

I tre maggiori aplotipi di COMT, associati ad una diversa sensibilità al dolore sono:

- G\_C\_G\_G; soggetti omozigoti per questo aplotipo hanno una più bassa risposta ad dolore, identificato come “ low pain sensitivity” (LPS);
- A\_T\_C\_A, soggetti omozigoti per questo aplotipo presentavano una media sensibilità al dolore, identificato come “ average pain sensitivity” (APS);
- A\_C\_C\_G, soggetti eterozigoti per questo e per il secondo genotipo (APS) presentavano la più alta sensibilità al dolore, definito “ high pain sensitivity” (HPS).

Polimorfismi non sinonimi del gene COMT sono stati osservati solo per rs 4680 in cui si verificava una sostituzione aminoacidica per cui una valina è sostituita ad una metionina in posizione 158. La sostituzione con la metionina produce un enzima con ridotta termostabilità, ciò determina un decremento della attività enzimatica. Sebbene la sostituzione 158 val>met in COMT poteva spiegare la grande responsività al dolore osservata in individui con aplotipo APS se

comparati con soggetti aventi aplotipo LPS, esso non spiega la più alta risposta al dolore osservata nei pazienti aventi l'aplotipo HPS quando comparati con quelli caratterizzati dall'aplotipo APS. Questo perché soggetti in cui è presente l'aplotipo HPS e LPS posseggono l'allele G che codifica per una più stabile variante (valina) nella proteina COMT. Quindi questo SNP da solo non poteva spiegare la diversa sensibilità al dolore. Alcuni studi (31,32,33) hanno supportato la teoria che il raggruppamento degli SNPs in aplotipi sia fortemente associato con un determinato fenotipo rispetto al singolo SNPs, infatti combinazioni di SNPs risultano avere un effetto sinergico sulla funzione della proteina e che SNPs sinonimi all'interno degli aplotipi di COMT possono avere effetti sulla funzione della proteina che aggrava l'effetto del singolo SNP.

Differenti e specifici aplotipi potrebbero avere un effetto sulla stabilità del mRNA di COMT e sull'efficacia della proteina tradotta, per verificare tale ipotesi furono trasfettate in cellule HES 293 cloni di cDNA di COMT corrispondenti ai tre maggiori aplotipi. L'espressione di COMT fu determinata andando a misurare l'attività enzimatica della proteina nel lisato di cellule trasfettate. Si osservò che aplotipi LPS inducevano una più alta attività di enzima COMT, comparandola con cellule in cui veniva fatto esprimere il cDNA dell'aplotipo APS, in linea con la previsione di una ridotta termostabilità dell'enzima COMT contenente met rispetto alla proteina che contiene val (LPS). Le cellule aventi aplotipi HPS presentavano livelli di COMT più bassi rispetto a

cellule in cui era presente l'aplotipo LPS. Questo può essere spiegato da una riduzione della quantità di proteina prodotta dall'aplotipo HPS, per cui si ipotizzò che questi aplotipi che inducevano una differente attività enzimatica di COMT dovuta ad una differente traduzione in proteina e non alla stabilità strutturale del mRNA. Per determinare la rilevanza clinica di questi risultati, sempre in questo studio, furono esaminati i polimorfismi nel gene COMT in relazione all'incidenza di disordini temporomandibolari in 170 pazienti. I risultati indicarono che 58 pazienti su 170 presentavano solo un "low COMT activity" (HPS e/o APS) e i rimanenti 112 pazienti presentavano un "high COMT activity" (LPS). 15 nuovi casi di TMD furono diagnosticati durante i tre anni di osservazione. Il "rate" d'incidenza era di due volte superiore nei pazienti con aplotipo HPS e APS rispetto ai soggetti LPS. Questo suggerì che la presenza di aplotipi HPS e/o APS fosse un fattore di rischio per lo sviluppo di patologie temporomandibolari. I meccanismi attraverso cui la diminuzione dell'attività di COMT influenza la percezione al dolore e lo sviluppo di TMD non è nota. È stato suggerito che la riduzione dell'attività di COMT, associata alla presenza della metionina nel codone 158 porta ad una diminuzione del contenuto di encefaline in certe regioni del Sistema Nervoso Centrale ed è associata all'umore e al dolore. Un altro probabile meccanismo è quello secondo cui la riduzione dell'attività di COMT determina un aumento dei livelli di catecolamine, che promuovono persistenti stati dolorosi attraverso la stimolazione dei recettori beta

adrenergici nel SNC e SNP. Questi risultati suggeriscono che specifici polimorfismi possono avere differenti effetti sull'espressione e l'attivazione di differenti varianti genetiche, influenzando la diversa percezione al dolore nell'uomo e il rischio di sviluppare complesse condizioni dolorose come disordini temporomandibolari. Nel 2006, sulla scia del lavoro dell'anno precedente, Diatchenko et al pubblicano su Science un articolo in cui si ipotizzava la probabile spiegazione della ridotta attività e della ridotta quantità dell'enzima COMT in soggetti HPS. Mediante il software mfold venne effettuata l'analisi della struttura dell' mRNA degli aplotipi LPS, APS e HPS, da tali dati i ricercatori evinsero che gli SNPs rilevanti per l'avvolgimento spaziale del messaggero erano due: rs 4680 e rs 4818. Le strutture dei due mRNA erano rilevantemente differenti e differenti erano i valori di  $\Delta G$  associati ai tre aplotipi.

(34).

Una differenza sostanziale nel valore della energia libera di Gibbs indica una differenza nella stabilità del messaggero, inoltre la forma che l'mRNA assume nello spazio con le code al 5'e al 3' è in grado di proteggere l'mRNA dalla azione delle RNAsi e quindi la sequenza aminoacidica di una proteina può essere la stessa, ma la quantità proteica può variare e quindi inficiare l'attività di un enzima. Tale aspetto rende a questo punto rilevanti anche tutti gli SNPs che non modificano l'aminoacido ma che potrebbero inficiare la struttura spaziale dell'RNA.

L'enzima COMT è una metiltransferasi magnesio-dipendente, è stato osservato che pazienti affetti da emicrania presentavano una riduzione della concentrazione di magnesio (35) e attraverso risonanza spettroscopica pazienti affetti da dolori alla testa e crampi muscolari presentavano una riduzione intracellulare di magnesio cerebrale; è stato così ipotizzato che la riduzione della concentrazione di magnesio fosse un fattore di rischio, determinando una maggiore predisposizione allo sviluppo di tali patologie.



## **SCOPO DEL LAVORO**

Negli ultimi anni, è stato chiarito che la nocicezione possiede caratteristiche ereditarie: studi effettuati su topi ed in seguito nell'uomo hanno dimostrato una stretta correlazione tra percezione del dolore e la presenza di fattori genetici (36).

In particolare l'enzima catecol-O-metiltransferasi (COMT) potrebbe essere implicato nella notevole variabilità interindividuale della percezione del dolore in modo particolare del dolore temporo-mandibolare.

Da quanto suddetto, appare interessante studiare il gene COMT in soggetti affetti da TMD della nostra area geografica e in un gruppo controllo, con i seguenti scopi:

- 1) Sequenziamento degli esoni e promotori del gene COMT dei soggetti appartenenti ai gruppi di studio
- 2) Valutazione della magnesemia nei soggetti affetti da TMD
- 3) Calcolo delle frequenze alleliche, a livello delle singole varianti geniche nel gene COMT nei gruppi di studio
- 4) Individuazione di aplotipi di SNPs caratterizzanti i gruppi dello studio
- 5) Valutazione statistica dei risultati ottenuti
- 6) Studio di predizione bioinformatica degli effetti delle varianti geniche trovate sulla struttura del DNA, RNA e proteina COMT.

## **MATERIALI E METODI**

Il progetto si è articolato in tre fasi, nella prima sono stati selezionati i soggetti da arruolare nello studio e nella seconda è stato analizzato il gene COMT nei gruppi di studio e nella terza fase è stata effettuata l'analisi statistica dei risultati e l'interpretazione diagnostica.

1. Selezione dei pazienti da includere nello studio:

- 50 soggetti con dolore temporo-mandibolare. I criteri di inclusione nello studio sono stati la presenza di dolore miofasciale da almeno 6 mesi con o senza limitata apertura. Nei pazienti doveva essere presente dolore o dolorabilità riferiti a mascelle, tempie, faccia, area preauricolare o intrauricolare a riposo o durante la funzione; dolore riportato alla palpazione di almeno tre siti sui venti di seguito elencati (vengono considerati separatamente il lato sinistro e destro per ogni muscolo): temporale posteriore, temporale medio, temporale anteriore, origine del massetere, corpo del massetere, inserzione del massetere, regione mandibolare posteriore, regione sottomandibolare, area del pterigoideo laterale e tendine del temporale. Almeno uno dei siti doveva essere omolaterale a dolore lamentato dal paziente.

I criteri di esclusione per lo studio sono stati la comorbilità con disturbi psichiatrici, incluso il disturbo di dipendenza da sostanze o da alcool, e la presenza di eccessivo uso di analgesici secondo i criteri ICHD-II (International

Classification of Headache Disorders). Ciascun paziente è stato sottoposto ad accurata anamnesi familiare, per evidenziare altri membri della famiglia putativamente affetti; in caso positivo, gli altri membri della famiglia sono stati a loro volta sottoposti a valutazione clinica specialistica.

- 120 soggetti controllo arruolati tra coloro che afferivano alla clinica odontoiatrica affetti da patologie odontoiatriche in assenza di dolore cronico o temporo-mandibolare.

Tutti i soggetti partecipanti allo studio (pazienti e controlli) erano originari del sud-Italia.

## 2. Analisi molecolare del gene COMT:

- Per ciascun soggetto è stato raccolto un campione di sangue periferico con EDTA per l'estrazione del DNA.
- Il DNA è stato estratto da leucociti utilizzando il kit commerciale "Nucleon BACC2" (Amersham Life Science) e successivamente è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica.
- Ogni campione di DNA di ciascun paziente è stato sottoposto alla ricerca di mutazioni e/o polimorfismi del gene COMT. Le condizioni per la reazione di PCR e la scelta degli oligonucleotidi sono specifiche per il tratto di DNA relativo al gene COMT. La strumentazione utilizzata per l'amplificazione dei prodotti di PCR è GeneAmp 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems.

Per il nostro studio il gene COMT è stato suddiviso in 9 parti:

- Il promotore distale P2, lungo circa 1500 bp a monte dell'esone 1 è stato suddiviso a sua volta in 3 parti per permetterne la completa amplificazione: un primo frammento di 635 bp, il secondo di 551 bp, il terzo di 465 bp.
- L'esone 1 è stato amplificato mediante oligonucleotidi che permettevano l'amplificazione dell'ultima parte del promotore P2 e l'intero esone di 112 bp.
- Il tratto di gene successivo, di 1579 bp che comprende l'esone 2 di 90 bp, promotore prossimale di 1200 bp e l'esone 3 di 298 bp è stato suddiviso in ulteriori 3 frammenti: uno di circa 1000 bp che parte dall'esone 2, il secondo e terzo di circa 500 bp ognuna.
- L'esone 4 di 194 bp e esone 5 di 132 bp sono stati amplificati come frammento unico (circa 2000 bp) comprendente anche l'introne 4.
- Infine l'esone 6 e la regione 3'UTR sono stati amplificati assieme mediante un frammento di circa 600 bp

Ogni parte di gene è stato amplificata usando oligonucleotidi specifici, messi a punto mediante il software Primer 3 (37).

ID OLIGONUCLEOTIDI	SEQUENZA OLIGONUCLEITIDI
P2 I parte F	GCTGAGATCGCACCACTGTA
P2 I parte R	AGAGTTCTGGGAGGCAGTCA
P2 II parte F	TATGGGAAGGGGAAGCTTTT
P2 II parte R	CATCCATGCACGACAACAT
P2 III parte F	GCCCATTCACACACACAGTC

P2 III parte R	CTCCCCAGACCCCTAGACTC
P2- Ex1 F	TTGCTCTGTGCAGCCTCTAA
P2-Ex2 R	CCCAACGTCAGATCACTTCA
Ex2-Ex3 1000bp F	TCCCTCCTCTTGTGGTTCAC
Ex2-Ex3 1000bp R	CCAGCTGGCTTAGAGGACAC
Ex2-Ex3 2000.1 F	TCAATGAAAAGGCCACATGA
Ex2-Ex3 2000.1 R	AGTGCTCTGTGCTCCTCCTG
Ex2-Ex3 2000.2 F	GCTGGCATTCTGAACCTTG
Ex2-Ex3 2000.2 R	TCCTGTAAGGGCTTTGATGC
Ex4-Ex5 F	GCATCAAAGCCCTTACAGGA
Ex4-Ex5 R	GGGCAGTGTGTCACTGATGT
Ex6 F	TGAGGAGCACCCATCC
Ex6 R	GGGGAGCTTTGAATGT

Le condizioni di amplificazione adottate nello studio, sono le seguenti:

PROMOTORE P2 I PARTE:

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 58° C per 20 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

PROMOTORE P2 II PARTE:

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 58° C per 20 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

□ PROMOTORE P2 III PARTE

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 58° C per 20 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

□ P2- ESONE 1 (ultima parte del promotore P2 ed Esone 1)

Denaturazione iniziale: 95° C per 2 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 56° C per 30 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 1 min.

Estensione finale: 72° C per 10 min.

□ ESONE 2 – ESONE 3 1000 bp:

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 58° C per 20 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

□ ESONE 2 - ESONE 3 2000.1:

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 60° C per 18 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

□ ESONE 2 – ESONE 3 2000.2:

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 60° C per 15 sec.      35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

□ ESONE 4 - ESONE 5 :

Denaturazione iniziale: 95° C per 2 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 55° C per 20 sec.      45 cicli
- Estensione: 72° C per 2 min.

Estensione finale: 72° C per 10 min.

□ ESONE 6:

Denaturazione iniziale: 95° C per 5 min.

- Denaturazione : 95° C per 30 sec.
- Appaiamento: 60° C per 8 sec.            35 cicli
- Estensione: 72° C per 30 sec.

Estensione finale: 72° C per 7 min.

La miscela di ciascuna reazione di amplificazione, ad eccezione di P2- ESONE 1, (Vf = 50 µl) conteneva: 200 ng di DNA stampo, 10 µM di ciascun primer, 25 µM di ciascun dNTP, 5 U/ml di Taq polimerasi, 25 µM di MgCl<sub>2</sub> e Buffer 10x.

La miscela di reazione per l'amplificazione di P2- Esone 1 conteneva DMSO 10 % e l'Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics), sistema enzimatico particolarmente adatto a lavorare in condizioni di elevata stringenza, essendo un complesso enzimatico altamente stabile alle alte temperature, per tale caratteristica adatta alla amplificazione di regione ricche in GC, regioni la cui amplificazione richiede energia termica per denaturare la doppia elica del DNA.

La Expand High Fidelity PCR System è una miscela costituita dalla Taq polimerasi e la Tgo DNA polimerasi, enzima con attività di riparo 3'-5'. Grazie a tale attività, la capacità di polimerizzazione, senza l'inserzione di mutazioni random, della Tgo è circa 5 volte superiore rispetto la Taq Polimerasi

Successivamente, i campioni di DNA amplificati sono stati sottoposti ad analisi mediante sequenziamento automatico .



La sequenza completa del gene è stata sottoposta ad analisi per la ricerca di polimorfismi e mutazioni mediante l'uso di un programma di assemblaggio (programma SeqScape v.2.5 Applied Biosystems).

## SEQSCAPE

Lo studio delle sequenze così ottenute è stato effettuato per mezzo del software SeqScape version 2.5 dell'Applied Biosystem. Le sequenze del gene COMT di ogni paziente sono state allineate rispetto alla sequenza del gene considerata “normale” utilizzata come riferimento. In questo modo il programma individua ogni variazione rispetto alla sequenza di riferimento e consente di analizzare queste variazioni tenendo conto di tutte le informazioni caratteristiche della sequenza come l'estensione degli esoni e degli introni, le regioni codificanti, i trascritti, le cornici di lettura tradotte (38)

## MAGNESEMIA E COMT

Come in precedenza descritto, attualmente vi sono evidenze che correlano la concentrazione del magnesio cerebrale con la maggiore predisposizione verso l'instaurarsi di dolore cronico. Alla luce di ciò, è stato dosato il magnesio sierico nei cinquanta soggetti affetti da patologie temporomandibolari in modo da valutare se un'eventuale riduzione di tale ione potesse essere misurata anche nel sangue periferico ed essere ricondotta ad un ridotta attività dell'enzima COMT.

## RISULTATI

I risultati conseguiti in ordine temporale sono i seguenti:

- 1) La messa a punto delle condizioni di amplificazione del gene COMT per il successivo sequenziamento degli esoni e dei promotori.
- 2) Il sequenziamento del gene COMT nei soggetti affetti da dolore temporo-mandibolare (n=50) e nei soggetti controllo (n=120).
- 3) Il confronto dei dati ottenuti dal sequenziamento dei 6 esoni e dei due promotori del gene COMT nei soggetti affetti da TMD e nei soggetti controllo con la sequenza di riferimento (GI: 51511751) e successive analisi statistiche.
- 4) La predizione di strutture secondarie di RNA e del valore di  $\Delta G$  mediante l'utilizzo del software mfold
- 5) Predizione della struttura tridimensionale della proteina COMT mutata in posizione 49189c>a, cambiamento nucleotidico che determina il cambio aminoacidico 58Arg>Ser.
- 6) Individuazione di aplotipi mediante l'utilizzo del programma Haploview.
- 7) Valutazione della magnesemia nei soggetti affetti da TMD.

Il primo risultato che abbiamo raggiunto ha riguardato la messa a punto delle condizioni di amplificazione e successivo sequenziamento degli esoni e dei promotori di COMT. In modo particolare l'ultima porzione del promotore P2 e la prima porzione dell'esone 1 rappresentano una regione genica ricca di CG. La messa a punto delle condizioni di PCR relative a tale porzione genica ha previsto

l'utilizzo del DMSO al 10% e della Taq Expander. Il primo risultato ottenuto è sicuramente di interesse prettamente metodologico.

I dati ottenuti dal sequenziamento del gene COMT nei soggetti affetti da patologie temporomandibolari e nei soggetti controllo sono stati confrontati con la sequenza di riferimento (GI: 51511751) e hanno evidenziato la presenza di numerose varianti geniche. Il sequenziamento dei 6 esoni e dei due promotori del gene COMT ha determinato l'individuazione di 40 SNPs la cui localizzazione genica è riportata in tab 1, di questi polimorfismi 18 risultano essere nuovi (i dati sono relativi a 4 studi di genetica di popolazione: Hap Map, SNP Cancer 500, NIH polymorphism discovery resource, Seattle SNPs program for genomic application). Tra i nuovi 18 SNPs ve ne è uno in posizione 49189 nell'esone 3 non sinonimo in quanto modifica un residuo di arginina in serina, tale polimorfismo ci è sembrato ovviamente molto interessante e ulteriori analisi sono state effettuate su di esso e i dati relativi sono riportati in seguito. In tab. 2 sono riportate esclusivamente le frequenze genotipiche degli SNPs nuovi.

Dopo aver sequenziato il gene COMT abbiamo cercato di capire se vi fossero SNPs che potessero essere associati all'insorgenza del dolore temporomandibolare. I dati sono stati analizzati mediante il software per analisi statistiche SPSS versione 16.0. Il primo passo da noi compiuto è consistito nella analisi univariata ( $\chi^2$  test) delle frequenze genotipiche dei 40 SNPs individuati nella nostra popolazione, confrontando casi e controlli. In tab.3 sono riportati i 3

SNPs che mostrano una associazione di livello statisticamente significativo con la malattia ed anche il polimorfismo rs4680 che aveva un valore di p di poco superiore al 0.05 (0.074). Tale scelta è stata dettata dalla possibilità di allargare le maglie della nostra analisi per essere certi di non perdere dati interessanti, in quanto in seconda battuta mediante la regressione logistica binaria le maglie verranno chiuse per ottenere una sostanziale scrematura dei dati. Abbiamo scartato però dalle successive analisi rs4646310 in quanto presente con frequenze in omozigosi troppo basse, e ciò avrebbe inficiato la bontà delle analisi successive. La regressione logistica binaria consente di individuare una relazione tra la variabile dipendente (nello specifico caso/controllo) e le variabili indipendenti (SNPs). Mediante questo tipo di approccio statistico si valuta il peso che ogni singolo polimorfismo possiede in maniera indipendente dagli altri. I risultati della regressione logistica binaria indicano come rs165656 l'unico polimorfismo in cui genotipi siano associati alla presenza del dolore temporo-mandibolare, il confronto wt/eterozigote ha un valore di p pari 0.001 mentre il confronto eterozigote/omozigote ha un valore di p pari a 0.011. Per quantificare il rischio di insorgenza di dolore temporo-mandibolare in soggetti portatori di rs165656 abbiamo calcolato il valore di Odds Ratio (OR) tra il genotipo (wt/omozigote) in funzione della assenza/presenza del dolore. Il valore di OR individuato è pari a 5.1 con intervallo di confidenza compreso tra 2 e 13. Ricordo che per intervallo di confidenza si intende l'intervallo entro cui ripetendo

innumerevoli volte la stessa ricerca con innumerevoli campioni estratti dalla medesima popolazione si calcola possa cadere il 95% delle stime. Se l'intervallo di confidenza è superiore al valore 1 allora l'ipotesi nulla viene soddisfatta, l'analisi statistica perde di significato e l'ipotesi per cui si supposeva l'esistenza di differenze tra due gruppi in funzione di due variabili viene ad essere annullata.

A questo punto abbiamo spostato la nostra attenzione all'interno del gruppo composto solo dai casi, per valutare l'eventuale associazione tra le frequenze genotipiche degli SNPs e le caratteristiche cliniche dei soggetti TMD. Le caratteristiche cliniche che abbiamo preso in considerazione sono state: diagnosi (soggetti che mostravano blocco o non della articolazione temporo-mandibolare), dolore cefalgico, dolore non cefalgico, problemi ormonali, rumore della articolazione temporo-mandibolare, terapie farmacologiche. Per effettuare le analisi statistiche le caratteristiche cliniche sono state trasformate in variabili dicotomiche (presenza o assenza del dato clinico). Abbiamo comparato le suddette caratteristiche con gli SNPs mediante la regressione logistica multinominale, modello statistico utile per studiare le situazioni in cui si desidera classificare i soggetti in base ai valori di un insieme di variabili indipendenti. Si tratta di un tipo di regressione simile alla regressione logistica, ma è più generale in quanto la variabile dipendente non è limitata a due categorie, nel nostro caso tale variabile è rappresentata dal polimorfismo nelle tre forme genotipiche. Le variabili indipendenti invece sono le caratteristiche cliniche dei soggetti TMD.

Nella regressione logistica multinominale abbiamo analizzato rs165656, rs165722 e rs4680, abbiamo considerato anche questi ultimi due SNPs che non hanno mostrato associazione statisticamente significativa alla logistica binaria con la presenza del dolore temporo-mandibolare, in quanto potrebbero essere polimorfismi che viaggiano in linkage disequilibrium, come di seguito dimostrato, e come tali sarebbero variabili dipendenti, quindi non analizzabili al meglio mediante il modello di regressione logistica binaria. I dati relativi alla regressione logistica multinominale mostrano che rs165656,  $p=0.02$ , e rs 165722,  $p=0.02$ , sono polimorfismi associati alla presenza del dolore cefalgico, in maniera specifica la differenza statisticamente significativa era presente tra wt ed omozigoti. Inoltre rs4680,  $p=0.04$ , è risultato essere associato alla presenza del dolore non cefalgico, anche in questo caso la differenza significativa delle frequenze è relativa ai soggetti wt/soggetti omozigoti.

Da qualche anno è ormai noto che gli SNPs sinonimi rivestono una grande importanza in quanto possono determinare cambiamenti della struttura del RNA e quindi, a parità di sequenza aminoacidica, la stabilità del messaggero può venire inficiata. Dopo la trascrizione l'RNA viene legato da un complesso proteico al 5' e poliadenilato al 3', tali modifiche proteggono il messaggero dall'azione delle ribonucleasi, in modo tale da rendere più lungo il processo di traduzione. Attualmente si pensa che cambiamenti strutturali dell'RNA possano renderlo maggiormente e precocemente sensibile al taglio enzimatico, ciò

potrebbe portare ad una quantità ridotta di messaggero che determina la riduzione della traduzione, quindi meno mRNA, meno proteina. In tal modo l'importanza degli SNPs sinonimi è balzata all'attenzione della comunità scientifica individuando in loro una fonte di meccanismi alla base di alterazioni metaboliche e/o patologie (39). Quindi non solo SNPs non sinonimi ma anche SNPs sinonimi (che non cambiano gli aminoacidi) possono modificare l'RNA. Attualmente uno dei programmi maggiormente in uso per la predizione della struttura degli acidi nucleici è mfold (40,41), software ideato da Zuker nel 2003 (42). Introducendo la sequenza nucleotidica, mfold è in grado di realizzare la predizione del "folding" degli acidi nucleici e di calcolare l'energia libera di Gibbs associata alle varie strutture del DNA e dell'RNA. Mediante mfold abbiamo analizzato i 40 SNPs andando a comparare la struttura del'RNA della forma wt con la forma mutata. Dei 40 SNPs oggetto di questa analisi, 8 hanno mostrato una sostanziale modifica del folding e del  $\Delta G$ , in tab.4 sono riassunti i dati relativi all'analisi con mfold di tali polimorfismi.

Inoltre, il polimorfismo 49189c>a è risultato presente esclusivamente in un soggetto affetto da TMD, tale SNP non sinonimo (arginina in serina) non è riportato in letteratura. Abbiamo pertanto voluto analizzare la struttura secondaria della proteina andando a valutare la sequenza aminoacidica wt e la sequenza mutata, l'analisi è stata effettuata valutando numerosi algoritmi mediante i quali si ottengono dati riguardanti il numero di: catene alfa, catena

3,10, catene Pi, ponti beta, extended strand, random coil, beta turn. Gli algoritmi utilizzati sono stati: Gor4, Sopl, Hnn, Predator, Soplma, Dsc, Dpm, tutti algoritmi che sono in grado di effettuare la predizione della struttura secondaria proteica, ognuno dei quali fornisce un'analisi maggiormente accurata e specifica per le varie conformazioni. Tale tipo di analisi è stata effettuata considerando la sequenza wt e la sequenza mutata in posizione 49189 c>a.

L'analisi delle conformazioni proteiche, i cui risultati sono riportati in fig. 2 mostrano che la presenza di 58Arg>Ser, rispetto al wt, determina il cambio della percentuale di alfa-elica, extended strand e random coil, con quasi tutti gli algoritmi, mentre una differenza della percentuale di beta turn è stata individuata solo da SOPM.

Se la predizione della conformazione proteica in funzione di una mutazione ha come primo passaggio obbligato lo studio della struttura secondaria, il secondo passaggio può essere rappresentato dalla analisi tridimensionale della proteina, analisi che però ha come "conditio sine qua non" la presenza in banca dati della analisi cristallografica della molecola.

Recentemente (43) è stata pubblicata la struttura tridimensionale della proteina COMT con la sostituzione Val-Met, tali dati ci hanno permesso di effettuare una predizione 3D della struttura proteica con la mutazione 58R>S da noi scoperta.

Nella figura 3 è mostrata la struttura cristallografica di COMT, si può osservare che R58 è localizzato nella faccia esterna della alfa elica H1 (gialla), esso forma



un ponte salino con Glu 37 (blu) collegato al loop 36-42 (celeste) che connette le alfa eliche H2 e H3. L'analisi tridimensionale di COMT 58Arg>Ser ha mostrato che tale mutazione distrugge le interazioni elettrostatiche che sussistono tra il residuo di arginina in posizione 58 e il residuo di acido glutammico in posizione 37 (blu). Glu 37 è anche correlato al residuo di tirosina in posizione 32 (blu), un altro residuo presente nella alfa elica H1. Arg 58 potrebbe interagire con la coda N-terminale dell'enzima COMT, determinando l'orientamento della elica H1 (gialla), tale azione è dovuta alla natura chimica del residuo, l'arginina è un aminoacido dotato di una catena laterale lunga e carica. Un ruolo simile non può sicuramente essere svolto dalla serina, residuo dotato di corta coda laterale, è plausibile dunque ipotizzare che la sostituzione 58R>S possa influenzare l'avvolgimento tridimensionale della proteina COMT. In fig.3 sono altresì mostrati i substrati enzimatici s-adenosilmetionina (SAM) in verde e 3,5-dinitro catecol (DNC) in Magenta di COMT studiati da Rutherford. Inoltre studi biochimici e di *modeling* molecolare hanno dimostrato che il segmento proteico 38-45 (coda N-terminale) dell'enzima COMT è correlato all'orientamento del sito catalitico coinvolto nell'interazione enzima-substrato. La sostituzione 58 Arg>Ser interagisce con la coda N-terminale, quindi è verosimile supporre che tale mutazione possa influenzare in qualche modo la flessibilità del segmento 38-45, andando quindi ad inficiare il riconoscimento enzima-substrato.

Abbiamo continuato lo studio di 49189c>a ed abbiamo voluto verificare se l'arginina in posizione 58 fosse o meno un aminoacido conservato nelle specie. L'allineamento è stato effettuato utilizzando i dati presenti in letteratura mediante Clustal W, programma in grado di effettuare l'allineamento tra sequenze aminoacidiche tra le varie specie (44). La posizione 58 rappresenta un residuo altamente conservato, infatti come si vede in fig. 4 è sempre presente l'arginina. Inoltre abbiamo voluto esaminare l'associazione tra i 40 SNPs individuati per verificare la presenza di aplogruppi che potessero co-segregare con la malattia o che potessero essere rappresentativi del gruppo dei controlli. Tale analisi è stata effettuata mediante Haploview, software in grado di determinare la presenza di SNPs che segregano assieme e che sono in grado di formare aploblocchi, questa ultima caratteristica è ovviamente conseguente anche della eventuale posizione limitrofa degli SNPs lungo il gene. Mediante Haploview abbiamo analizzato la popolazione costituita dai pazienti affetti dal dolore temporo-mandibolare e abbiamo riscontrato due aplogruppi costituiti da rs165656/rs165722 ( $D'=0.9$ ) e rs2020917/rs4680 ( $D'=0.9$ ). Ricordiamo che i primi due polimorfismi sono risultati essere associati, alla analisi univariata, all'insorgenza del dolore temporo-mandibolare (rs165656) e alla co-presenza del dolore alla testa (rs165656 e rs165722), inoltre rs4680 è il polimorfismo che alla regressione logistica multinominale è risultato essere associato al dolore non cefalgico.

Infine, abbiamo voluto valutare il ruolo della magnesemia nei soggetti TMD ma dai dati ottenuti è risultato che la concentrazione del magnesio sierico non varia rispetto alla norma, valore medio misurato in TMD di 2.06 mg/dl (intervallo di normalità 1.58-2.55 mg/dl).

## **DISCUSSIONE**

Il primo dato di interesse scientifico nel nostro lavoro è rappresentato dalla caratterizzazione di tutto il gene COMT in soggetti affetti da TMD. Fino ad ora infatti tutti i lavori hanno valutato pochi SNPs, talora esclusivamente il polimorfismo 158val>met, che hanno poi messo in correlazione con vari tipi di malattie e/o disturbi (17, 18, 21-27). In particolare, un primo gruppo nell'Università del Nord Carolina ha posto la sua attenzione sul possibile ruolo di variante geniche del gene COMT nella definizione di una soglia più bassa del dolore, soffermandosi su quello temporo-mandibolare (45,46,47).

Noi abbiamo voluto esplorare tutto il gene COMT sequenziando tutti gli esoni e i due promotori. Tale tipo di approccio è risultato altamente indaginoso in particolare per la messa a punto delle condizioni di amplificazione dell'ultima porzione del promotore P2 e dell'intero esone 1, che ha richiesto l'utilizzo di una miscela di reazione particolare contenente DMSO e Taq Expander. Difficoltà nell'amplificare tale regione del gene erano già state descritte in letteratura, nel 2004 infatti Shield e il suo gruppo avevano provato, senza successo, a sequenziare il gene COMT, fallendo, in particolare nell'esone 1, zona estremamente ricca di GC (48).

Il completo sequenziamento del gene COMT nella popolazione oggetto del nostro studio (soggetti TMD e soggetti controllo) ha portato all'individuazione di 40 SNPs, di questi 18 non ancora presenti in letteratura. Questo dato è

interessante in un'ottica di genetica delle popolazioni, in quanto rappresenta la descrizione delle varianti alleliche del gene COMT nell'area campana. Altri studi presenti in letteratura di genetica delle popolazioni (49,50,51,52) hanno analizzato per sequenza una gamma di geni, tra cui anche COMT peccano per esiguità degli individui studiati (da 31 a 60). Spesso, pertanto, le frequenze alleliche riportate possono non essere del tutto rappresentative della popolazione esaminata. Un esempio è quello del progetto SNP Cancer 500 nel quale i soggetti caucasici analizzati sono solo 31, è chiaro che una numerosità così piccola rende i dati genetici quanto meno discutibili. I nostri dati derivano invece da una popolazione maggiormente numerosa (170 soggetti), quindi è verosimile ipotizzare che le frequenze alleliche da noi individuate abbiano un maggiore peso statistico. Gli studi citati in precedenza hanno analizzato popolazioni miste, tra cui anche soggetti caucasici, nel nostro caso invece la popolazione oltre ad essere maggiormente numerosa e altresì maggiormente selezionata in quanto costituita esclusivamente da individui originari della regione Campania, da ciò risulta abbastanza chiaro che le frequenze da noi riscontrate dovrebbero dare un quadro preciso e rappresentativo di una popolazione arruolata in una specifica area geografica dell'Italia. Quindi il primo dato relativo alle nostre frequenze alleliche ha un valore in termini di genetica delle popolazioni. Il passaggio successivo è stato l'analisi delle frequenze dei vari SNPs in COMT in relazione alla patologia confrontando casi

e controlli (test del  $\chi^2$  e successiva correzione di Bonferroni) Dei 3 SNPs associati con la presenza della patologia, dopo aver eliminato rs4646310 per la loro bassa omozigosità, la regressione logistica binaria ha indicato che rs165656 è l'unico polimorfismo chiaramente associato all'insorgenza del dolore temporo-mandibolare. I soggetti portatori della variante hanno un OR per il TMD (wt/omozigote) di 5.1. Rs165656 è un SNP presente nel promotore P1, in letteratura è presente un unico lavoro che descrive il polimorfismo succitato, in associazione allo sviluppo di ritardo mentale nella popolazione Han Cinese (53). Gli autori però non formulano ipotesi circa i meccanismi alla base di tale riscontro oggettivo. Nello stesso studio è stato valutato anche rs4680 (158val>met), polimorfismo che determina un forte decremento della attività enzimatica e di cui esistono numerose evidenze sperimentali di associazione all'insorgenza di numerose patologie relative alla sfera cognitivo-comportamentale, che tuttavia non è risultato essere associato al ritardo mentale nella popolazione Han cinese (53). L'analisi regressione logistica multinominale ci ha consentito di analizzare i soggetti affetti da dolore temporo-mandibolare in funzione di alcune caratteristiche cliniche sia diagnostiche (soggetti che mostravano blocco o non della articolazione temporo-mandibolare) che di co-morbilità: dolore cefalgico, dolore non cefalgico, problemi ormonali, rumore della articolazione temporo-mandibolare, terapie farmacologiche. Ovviamente da tale tipo di studio è stato escluso il gruppo controllo in quanto

costituito da soggetti non affetti da alcuna forma di dolore cronico. Nello specifico, abbiamo creato dei sottogruppi in funzione delle caratteristiche cliniche che sono state analizzate geneticamente, abbiamo riscontrato che due di questi sottogruppi sono caratterizzati da polimorfismi specifici. In particolare, abbiamo dimostrato che rs165656 e rs165722 sono polimorfismi associati alla insorgenza del dolore cefalico nei pazienti con TMD e rs4680 è invece associato alla presenza di dolore non cefalgico. Questo dato è in accordo con i successivi risultati ottenuti con l'analisi degli aplotipi in cui si osserva che rs165656/rs165722 sono due SNPs che viaggiano in linkage disequilibrium all'interno del gruppo TMD, quindi l'associazione di questi due polimorfismi con l'insorgenza del dolore cefalgico è un'ulteriore controprova dello stretto legame esistente tra rs16565 e rs165722. Inoltre anche rs2020917/rs4680 è un aplotipo del gruppo TMD, ciò rappresenterebbe un'ulteriore prova della associazione tra rs4680 e la presenza di dolore non cefalgico in soggetti affetti da dolore temporo-mandibolare, come dimostrato mediante la regressione logistica multinominale.

Rs165656 e rs165722 sono 2 SNPs associati e come tali non possono essere considerati come variabili indipendenti. Infatti, entrambi analizzati in maniera singola mediante il  $\chi^2$  test mostrano una forte associazione alla patologia, ma poi il passo seguente (regressione logistica binaria) scarta rs165722, probabilmente perché tra i due è quello con una forza statistica associativa minore.

Da tempo è noto che il gene COMT possiede nei due promotori delle regioni ERE (estrogen responsive element), è lecito e facile pensare che tali regioni possano, legate agli ormoni, andare ad interferire con i normali processi di trascrizione del gene COMT (54). Questa ipotesi è in accordo con l'osservazione che le donne sono maggiormente sensibili a sviluppare forme di dolore cronico (55). I polimorfismi associati a dolore temporo-mandibolare e dolore cefalgico, rs165656 e rs165722 non sono presenti in regione ERE né in altre regioni (TATA box, elementi CEBP, CREB) regolatorie note del gene COMT, da ciò si può escludere un'eventuale loro ruolo nella modulazione della trascrizione. Il reale coinvolgimento dei suddetti polimorfismi dovrebbe essere studiato in dettaglio effettuando saggi funzionali, ad esempio trasfettando in cellule vettori esprimenti gli SNPs e verificando l'espressione del gene, mediante saggi che valutano l'attività del gene COMT (30). Tali saggi non sono stati oggetto del presente progetto, ma possono rappresentare un'eventuale estensione.

Analogamente, la nuova mutazione da noi riscontrata, 58Arg>Ser in un paziente TMD, potrebbe avere un ruolo nella modulazione della attività enzimatica dell'enzima COMT, andando sia a modificare l'orientamento spaziale della sua alfa elica H1, sia interagendo con la porzione proteica 38-45 che svolge un ruolo nella modulazione della interazione substrato-enzima.

Infine, l'analisi delle strutture secondarie dell'RNA ha mostrato che dei 40 SNPs oggetto del nostro studio, 8 determinano una modifica sia



dell'avvolgimento spaziale che del  $\Delta G$ . In particolare, i  $\Delta G$  forme mutate da noi riscontrati sono maggiormente negativi e ciò è indice di maggiore instabilità del sistema. Un RNA più instabile è presente nel citoplasma per un tempo minore e tale situazione determina la riduzione della attività traduzionale, che determina una quantità di proteina ridotta.

In conclusione, il sequenziamento completo del gene COMT in soggetti con insorgenza del dolore temporo-mandibolare ci ha consentito di ottenere originali paragonati con quelli del gruppo di Diatchenko che ha studiato tale tematica in dettaglio negli ultimi anni (30,45) ma limitandosi nello studio all'analisi di solo 4 polimorfismi nel gene COMT. Il nostro studio, tramite l'intero sequenziamento del gene COMT, ha evidenziato 18 nuove varianti con probabile significato patogenetico nell'insorgenza del dolore temporo-mandibolare e del dolore cefalgico ad esso associato.

Inoltre, per 8 di queste varianti l'analisi strutturale ha permesso di accertare un cambio del valore del  $\Delta G$  e dell'avvolgimento spaziale del RNA, caratteristica quest'ultima fortemente correlata alla quantità di proteina tradotta. Ovviamente tali analisi di predizioni di strutture sia della proteina, che dell'RNA vanno dimostrate mediante saggi funzionali sulla attività dell'enzima COMT.

Tali varianti potranno essere studiate anche in tutta quella serie di patologie psichiatriche alle quali il gene COMT è stato precedentemente correlato. E' stata inoltre evidenziata una nuova mutazione, analizzata anche dal punto di vista

strutturale (58Arg>Ser), andando a studiare le modifiche indotte dalla variante nella struttura tridimensionale dell'enzima COMT tramite cristallografia.

Il nostro studio, anche se mostra una piccola pecca rappresentata dal numero dei soggetti esaminati TMD (n=50), ha tuttavia utilizzato criteri di inclusione molto accurati ed ha altresì analizzato un gruppo di soggetti controllo sicuramente sufficiente in termini numerici (rapporto 2,4 tra casi/controlli) ai fini di risultati significativi da un punto di vista statistico.

Ciò ci consente senza dubbio di affermare che varianti del gene COMT hanno un ruolo nell'insorgenza del dolore temporo-mandibolare.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. <http://www.iasp.org>
2. <http://www.who.int/en>
3. Von Korff M, et al. First onset of common pain symptoms: a prospective study of depression as a risk factor. *Pain*.1993;55:251-8
4. Ballegaard V et al. Are headache and temporomandibular disorders related? A blinded study. *Cephalalgia*, 2008, 28: 832–41
5. Dworkin SF et al. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandib Disord*. 1992; 6: 301-55
6. Bell W.E. Temporomandibular disorders: classification, diagnosis, management, ed 2 Chicago, Year Book Medical Publisher Inc, 1986
7. [www.oandp.org](http://www.oandp.org)
8. [www.ihs.org](http://www.ihs.org)
9. Marbach JJ, Levitt M. Erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in facial pain patients. *J Dent Res*. 1976 Jul-Aug; 55(4): 711-14
10. Jain KK et al. Current challenges and future prospects in management of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother*. 2008 Nov;8(11):1743-56
11. Villemure C, et al. Cognitive modulation of pain: how do attention and emotion influence pain processing? *Pain*. 2002;95:195-9.
12. <http://www.genecards.org/>

13. Tenhunen J et al. Genomic organization of the human catechol-O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 1994; 223: 1049-59
14. Khasar SG et al. Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain*. 2005 Jul; 116(1-2): 79-86
15. Gürsoy S et al. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome *Rheumatol. Int.* 2003 May;23(3): 104-7
16. Nackley AG et al. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. *Pain*. 2007 Apr;128(3):199-208
17. Zubieta et al. COMT 158val>met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 2003;299:1240-1243
18. Emin Erdal M et al. Significance of the catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in migraine. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Oct 19;94(1-2):193-6.
19. Antonimi et al. COMT inhibition with tolcapone in the treatment algorithm of patients with Parkinson's disease (PD): relevance for motor and non-motor features. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Feb;4(1):1-9
20. Riley B et al. Molecular genetic studies of schizophrenia. *Eur J Hum Genet*. 2006 Jun;14(6):669-80

21. Murphy et al. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome Arch Gen Psychiatry 1999;56:940-5
22. Karayiorgou et al. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder PNAS 1997;94:4572-5
23. Rothe C et al. Association of the 158val>met catechol O-methyltransferase genetic polymorphism with panic disorder. Neuropsychopharmacology. 2006 Oct;31(10):2237-42
24. Hallelund H et al. Association between Catechol O-methyltransferase (COMT) haplotypes and severity of hyperactivity symptoms in Adults. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.2008 Sep 18. (Epub ahead of print)
25. Mikołajczyk E et al. Association of eating disorders with catechol-o-methyltransferase gene functional polymorphism. Neuropsychobiology. 2006;54(1):82-6
26. Montag C et al. COMT genetic variation affects fear processing: psychophysiological evidence. Behav Neurosci. 2008 Aug;122(4):901-9
27. Burdick KE et al. COMT genotype increases risk for bipolar I disorder and influences neurocognitive performance Bipolar Disord. 2007 Jun;9(4):370-6
28. Sasaki M et al. Multiple promoters of catechol-O-methyltransferase gene are selectively inactivated by CpG hypermethylation in endometrial cancer. Cancer Res 2003;63:3101-6

29. Rakvag et al. The 158val>met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. *Pain*. 2005 Jul;116(1-2):73-8.
30. Diatchenko et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* 2005 Jan 1;14(1):135-43.
31. Shifman S et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet*.2002 Dec;71(6):1296-302.
32. Abiola O et al. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet*.2003 Nov;4 (11):185-91
33. Mogil JS et al. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1999 Jul 6;96(14):7744-51
34. Nackley et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006 Dec 22;314(5807):1930-3
35. Altura BM et al.Tension headaches and muscle tension: is there a role for magnesium? *Medical Hypotheses* (2001) 57(6): 705-713
36. McGrath PA. Psychological aspects of pain perception. *Arch Oral Biol*. 1994;39-42
37. <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

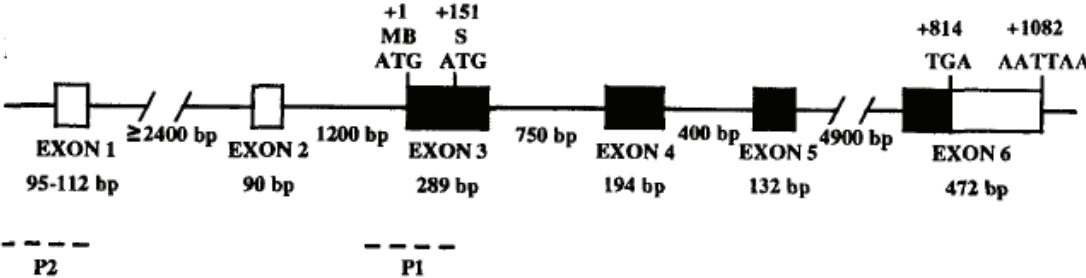
38. Product Bulletin, 2005 SeqScape Software version 2.5 comprehensive analysis solution for resequencing applications. Applied Biosystem
39. Duan et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DrD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. Hum Mol Genet 2003 12:205-16
40. <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>
41. <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rns-form1.cgi>
42. M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 2003 31 (13): 3406-15
43. Rutherford et al. Crystal structures of human 108V and 108M catechol-O-methyltransferase. J Mol. Biol. 2008, 380:120-30
44. Clustal W Protein sequences (Des Higgins, EBI, Hinxton Hall, UK) [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_server.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html)
45. Diatchenko et al. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms are associated with multiple pain-evoking stimuli. Pain. 2006 Dec 5;125(3):216-24
46. Slage J et al. Influence of psychological factors on risk of temporomandibular disorders. J Dent Res 2007 Nov;86(11):1120-5.
47. Slage J et al. Orthodontic Treatment, Genetic Factors and Risk of Temporomandibular Disorder Semin Orthod. 2008 Jun;14(2):146-156.

48. Shield AJ et al. Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Molecular Psychiatry* 2004 9: 151–160
49. <http://www.hapmap.org/>
50. [www.snp500cancer.nci.nih.gov/home.cfm](http://www.snp500cancer.nci.nih.gov/home.cfm)
51. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
52. [www.pga.gs.washington.edu/](http://www.pga.gs.washington.edu/)
53. Zhang K et al. An association study between catechol-*O*-methyltransferase gene and mental retardation in the Chinese Han population. *Neuroscience Letters* 2007, 419: 83–7
54. Xie T et al. Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-*O*-methyltransferase gene transcription. *Molecular Pharmacology* 1999 56:31–8
55. Janal MN et al. Prevalence of myofascial temporomandibular disorder in US community women. *J Oral Rehabil* 2008 Nov;35(11):801-9



**FIGURE**

**Fig. 1 Organizzazione del gene COMT sul cromosoma 22**



## Fig.2 Predizione struttura secondaria 49189 c>a 58Arg>Ser

**GOR4:** Alpha helix (Hh): 109 is 40.22%  
Random coil (Cc): 119 is 43.91%

**DPM :** Extended strand (Ee): 60 is 22.14%  
Random coil (Cc): 115 is 42.44%

**DSC :** Alpha helix (Hh): 125 is 46.13%  
Extended strand (Ee):  
21 is 7.75% Random coil (Cc): 125 is 46.13%

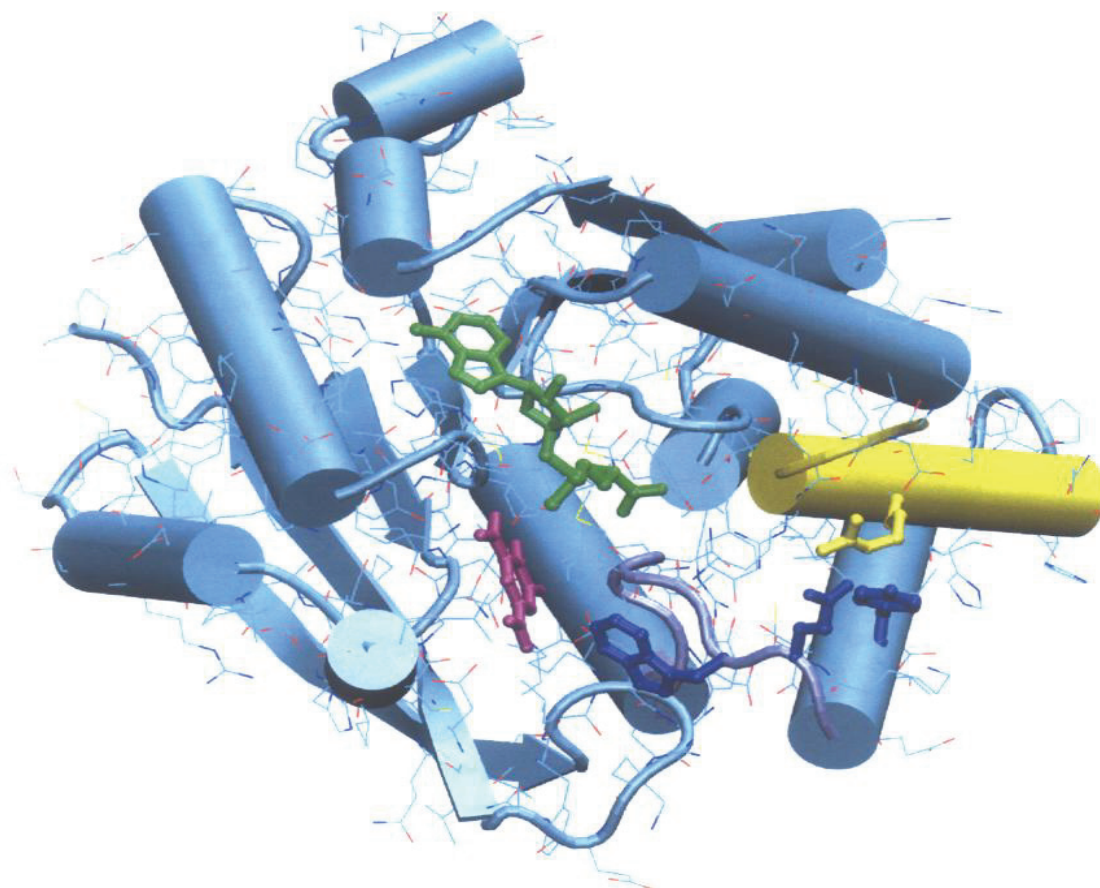
**HNNC :** Alpha helix (Hh) : 130 is 47.97%  
Random coil (Cc): 101 is 37.27%

**MLRC :** Alpha helix (Hh): 134 is 49.45%  
Extended strand (Ee): 36 is 13.28%  
Random coil (Cc): 101 is 37.27%

**PHD :** Alpha helix (Hh): 128 is 47.23%  
Extended strand (Ee): 53 is 19.56%  
Random coil (Cc): 90 is 33.21%

**SOPM :** Beta turn (Tt): 35 is 12.92%

**Fig.3** Analisi cristallografica della struttura proteica COMT ed interazione con i substrati dell'enzima SAM (verde) e DNC (magenta). In giallo è rappresentata  $\alpha$ -elica H1 contenente il residuo Arg (giallo).



**Fig.4 Allineamento del gene COMT tramite Clustal W che mostra come il residuo di arginina (R) sia altamente conservato tra le specie**

		10	20	30	40	50	60
A7MBI7 Bos taurus	A7MBI7	MLEAP	PLLLVAGG	VGLALLAL	RWLATT	DLQFF	GRAFIV
Q99028 Sus scrofa	Q99028	MLEAP	PLLLVAGG	VGLALLAL	RWLATT	DLQFF	GRAFIV
Q5H879 Equus caballus	Q5H879	MLEPT	PMLLAAF	SLLGLALL	PLLF	FLRR---	WGMLLIG
P21964 Homo Sapiens	P21964	MPEAP	PLLLAAV	LLGLVLL	VLLLL	LRHWG-	WGLCLIG
O88587 Mus musculus	O88587	-----	MLLAAV	SLGLLL	LAFL	LLLRHLG-	--WGLVA
P22734 Rattus norvegicus	P22734	-----	MPLAAV	SLGLLL	LALL	LLLRHLG-	--WGLVT
	<u>Prim.cons.</u>	MLEAP	PMLLAAV	SLGL2	LLALL	LLLR2	LG2F
		70	80	90	100	110	120
A7MBI7	A7MBI7	LQHVL	QHAVAG	DPQSV	VAAID	SYSE	EKEWAM
Q99028	Q99028	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q5H879	Q5H879	LRHVL	QHAVAG	DPQSV	LETID	AYCS	QKEWAM
P21964	P21964	LNHVL	QHAE	PGNA	QSVLE	AIDTY	CEQKEW
O88587	O88587	LRHV	QHA	KPGDP	QSVLE	AIDTY	CSQKEW
P22734	P22734	LRVY	QNAK	PDPQ	SVLEA	IDTYC	TQKEW
	<u>Prim.cons.</u>	LRHVL	QHA2	PGDP	QSVLE	AIDTY	CSQKEW
		130	140	150	160	170	180
A7MBI7	A7MBI7	GYSAV	RMARLL	LPGAR	LLTIE	FNPD	YAAIT
Q99028	Q99028	GYSAV	RMARLL	LPGAR	LLTIE	FNPD	YAAIT
Q5H879	Q5H879	GYSAV	RMARLL	PPGAR	LLTIE	INPD	YAAIT
P21964	P21964	GYSAV	RMARLL	SPGAR	LITIE	INPD	CAAIT
O88587	O88587	GYSAV	RMARLL	PPGAR	LLTME	INPD	YAAIT
P22734	P22734	GYSAV	RMARLL	QPGAR	LLTME	MNPD	YAAIT

## TABELLE

**Tab. 1 Frequenze genotipiche dei polimorfismi del gene COMT nei pazienti affetti da dolore temporo-mandibolare e nei controlli**

Gene COMT	Localizzazione	Polimorfismi	Genotipo	TMD, n(%)			Controlli, n (%)		Valore p	Genotipi nella banca dati	
				Totale 50	Donne 44	Uomini 6	Totale 120	Donne 80			Uomini 40
			rs9332314								
	P2	26968c>t	C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	119 (99.2)	80(00)	39(97.5)	Ns	98,3
			C/T	1 (2)	1(2.3)	-	1 (0.8)	-	1(2.5)		1.7
			T/T	-	-	-	-	-	-		-
			26971g>a								
	p2	26971g>a	G/G	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)	Ns	nuovo
			G/A	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-		
			A/A	-	-	-	-	-	-		
			rs1800706								
	p2	26990g>a	G/G	21(42)	20(45.5)	1(16.7)	50 (41.7)	36 (45)	14(35)		53.8
			A/A	6(12)	5(11.4)	1(16.7)	19 (15.8)	12(15)	7(17.5)	Ns	7,7
			A/G	23(46)	19(43.2)	4(66.7)	51 (42.5)	32(40)	19(47.5)		38,5
			rs2075507								
	p2	27060g>a	G/G	10(20)	9(20.5)	1(16.7)	25 (20.8)	19 (23.8)	6(15)		15.4
			G/A	22(44)	18(40.99)	4(66.79)	56 (46.7)	37(46.2)	19 (47.5)	Ns	57,7
			A/A	18(36)	17(38.6)	1(16.7)	39 (32.5)	24(30)	15(37.5)		26,9
			27390A/T								
	P2	27390 a>t	A/A	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)		
			A/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	
			T/T	-	-	-	-	-	-		
			27427g>t								
	p2	27427g>t	G/G	49(98)	43(97.7)	6(100)	119 (99.2)	80(100)	39(97.5)		nuovo
			G/T	1(2)	1(2.3)	-	1 (0.8)	-	1(2.5)	Ns	
			T/T	-	-	-	-	-	-		
			rs45551837								
	p2	27550g>a	G/G	48(96)	42(95.5)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)		Nd
			G/A	2(4)	2(4.5)	-	-	-	-	Ns	Nd
			A/A	-	-	-	-	-	-		Nd
			rs4646310								
	p2	27774g>a	G/G	31(62)	25(56.8)	6(100)	94 (78.3)	67 (83.75)	27 (67.5)		66.5
			G/A	18(36)	18(40.9)	-	21 (17.5)	10(12.5)	11(27.5)	0,03°	34,5
			A/A	1(2)	1(2.3)	-	5 (4.6)	3(3.75)	2(5.0)		-
			27780a>g								
	p2	27780 a>g	A/A	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)		nuovo
			A/G	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-	Ns	
			G/G	-	-	-	-	-	-		
			rs2020917								
	P2	27852t>c	T/T	6(12)	5(11.4)	1(16.7)	19 (15.8)	10(12.5)	9(22.5)		11,7
			C/T	21(42)	17(38.6)	4(66.7)	38 (31.7)	26(32.5)	12(30)	Ns	40
			C/C	23(46)	22(50)	1(16.7)	63 (52.5)	44 (55)	19 (47.5)		48.3
			rs13306278								

		C/C	31(62)	31(70.5)	-	93 (77.5)	61 (76.25)	32 (80)		Nd	
P2	27995c>t	C/T	13(26)	10(22.7)	3(50)	19 (15.8)	15(18.75)	4(10)	Ns	Nd	
		T/T	6(12)	3(6.8)	3(50)	8 (6.7)	4(5)	4(10)		Nd	
		28153g>t									
		G/G	50(100)	44(100)	6(100)	118 (98.3)	80(100)	38(95)		nuovo	
P2	28153g>t	G/T	-	-	-	2 (1.7)	-	2(5)	Ns		
		T/T	-	-	-	-	-	-			
		28231c>t									
p2	28231c>t	C/C	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)		nuovo	
		C/T	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-	Ns		
		T/T	-	-	-	-	-	-			
		28363g>c									
		G/G	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)			
Ex1	28363g>c	G/C	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	nuovo	
		C/C	-	-	-	-	-	-			
		rs34445020									
		G/G	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)		Nd	
Int1	47540g>a	G/A	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	Nd	
		A/A	-	-	-	-	-	-		Nd	
		rs165656									
		G/G	13(26)	12(27.3)	1(16.7)	55 (45.8)	42 (52.5)	13 (32.5)		22.5	N=31
p1	47831g>c	C/C	17(34)	16(36.4)	1(16.7)	14 (11.7)	6(7.5)	8(20)		19,4	^
		G/C	20(40)	16(36.4)	4(66.7)	51 (42.5)	32(40)	19(47.5)	0.001°	58,1	
		rs9332361									
		C/C	48(96)	42(95.5)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)		100	N=31
p1	47960c>t	C/T	2(4)	2(4.5)	-	-	-	-	Ns	-	^
		T/T	-	-	-	-	-	-		-	
		rs165722									
		C/C	13(26)	12(27.3)	1(16.7)	57 (47.5)	40 (50)	17 (42.5)		25.8	N=31
p1	47981c>T	T/T	16(32)	15(34.1)	1(16.7)	18 (15)	11 (13.75)	7(17.5)		19,4	^
		C/T	21(42)	17(38.6)	4(66.7)	45 (37.5)	29 (36.25)	16(40)	0.01°	54,8	
		rs9332362									
		G/G	50(100)	44(100)	6(100)	117 (97.5)	78(97.5)	39(97.5)		97.4	N=90
P1	48071 g>a	G/A	-	-	-	3 (2.5)	2 (2.5)	1(2.5)	Ns	1.3	°
		A/A	-	-	-	-	-	-		1.3	
		48612g>c									
		G/G	10(20)	9(20.5)	1(16.7)	30 (25)	21 (26.65)	9(22.5)		nuovo	
P1	48612g>c	G/C	24(48)	20(45.5)	4(66.7)	48 (40)	31 (38,75)	17(42.5)	Ns	nuovo	
		C/C	16(32)	15(34.1)	1(16.7)	42 (35)	28 (35)	14 (35)		nuovo	
		48621c>t									
		C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)			
P1	48621c>t	C/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	nuovo	
		T/T	-	-	-	-	-	-			
		rs11569716									
		T/T	49(98)	43(97.7)	6(100)	118 (98.3)	78(97.5)	40(100)		96.6	N=52
P1	48715t>c	T/C	1(2)	1(2.3)	-	2 (1.7)	2 (2.5)	-	Ns	3,4	^
		C/C	-	-	-	-	-	-		-	
		rs6268									
		C/C	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)		Nd	
P1	48853c>t	C/T	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-	Ns	Nd	
		T/T	-	-	-	-	-	-		Nd	

		48869 c>t												
		C/C	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)-						
P1	48869 c>t	C/T	-	-	-	1(0.8)	1(1.25)	-	Ns	nuovo				
		T/T	-	-	-	-	-	-						
		Rs6269												
		A/A	18(36)	17(38.6)	1(16.7)	43 (35.8)	29 (36.25)	14 (35)						Nd
P1	48920 a>g	G/G	11(22)	10(22.7)	1(16.7)	39 (32.50)	29 (36.25)	10(25)	Ns	Nd				
		A/G	21(42)	17(38.6)	4(66.7)	38 (31.7)	22 (27.5)	16(40)						Nd
		49189c>a												
		C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)						
Ex3	49189c>a	C/A	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	nuovo				
		A/A	-	-	-	-	-	-						
		Rs4633												
		C/C	18(32)	16(36.3)	2(33.3)	41 (34.2)	28 (35.5)	13 (32.5)						25.8
Ex3	49203c>t	T/T	14(32)	13(29.5)	1(16.7)	35 (29.1)	26 (32.5)	9(22.5)	Ns	19,4				N=31 ^
		C/T	18(36)	15(34.1)	3(50)	44 (36.7)	26 (32.5)	18(45)						54,8
		rs740602												
		G/G	49(98)	43(97.7)	6(100)	117 (97.5)	77(92.5)	40(100)						96.7
Ex3	49236g>a	G/A	1(2)	1(2.3)	-	3 (2.5)	3 (75)	-	Ns	3,3				N=31 ^
		A/A	-	-	-	-	-	-						-
		49559c>t												
		C/C	48(96)	42(95.5)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)						
int3	49559c>t	C/T	2(4)	2(4.5)	-	-	-	-	Ns	nuovo				
		T/T	-	-	-	-	-	-						
		rs4818												
		C/C	16(32)	14 (32)-	2(33.3)	37 (30.8)	25 (31.25)	12 (30)						32.3
ex4	50175c>g	C/G	23(46)	20(45.5)	3(50)	56 (46.7)	40 (50)	16(40)	Ns	51,6				N=31 ^
		G/G	11(22)	10(22.7)	1(16.7)	27 (22.5)	15 (18.75)	12(30)						16,1
		rs4680												
		G/G	15(30)	14 (32)	1(16.7)	52 (43.3)	38 (47.5)	14 (35)						21.7
ex4	50239g>a	G/A	20(40)	16(36.4)	4(66.7)	44 (36.7)	28 (35)	16(40)	Ns	53,3				N=60 *
		A/A	15(30)	14(31.8)	1(16.7)	24 (20)	14 (17.5)	10(25)						25
		50482g>c												
		G/G	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)						
int4	50482g>c	G/C	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-	Ns	nuovo				
		C/C	-	-	-	-	-	-						
		50493g>a												
		G/G	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	80(100)	39(97.5)						
int4	50493g>a	G/A	-	-	-	1 (0.8)	-	1(2.5)	Ns	nuovo				
		A/A	-	-	-	-	-	-						
		50648c>t												
		C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)						
int4	50648c>t	C/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	nuovo				
		T/T	-	-	-	-	-	-						
		rs165631												
		C/C	46(92)	40(90.9)	6(100)	116 (96.7)	77(96.25)	39(97.5)						87
ex5	50772c>t	C/T	4(8)	4(9.1)	-	4 (3.3)	3 (3.75)	1(2.5)	Ns	13				N=31 ^
		T/T	-	-	-	-	-	-						-
		rs769224												
		G/G	47(94)	41(93.2)	6(100)	111 (92.5)	72(90)	39(97.5)						91.7

ex5	50784g>a	G/A	3(6)	3(6.8)	-	9 (7.5)	8 (10)	1(2.5)	Ns	8,3	N=24§
		A/A	-	-	-	-	-	-		-	
		Rs3838146									
3'UTr	Wt-7c		8(16)	7(15.9)	1(16.7)	34(28.3)	26(32.5)	8(20)			
3' UTR	Etero 7c-8c		18(36)	14(31.8)	4(66.7)	26(21.6)	15 (18.8))	11(27.5)	Ns	43	N=31
3' UTR	Omo-8c		23(46)	22(50)	1(16.7)	60(50)	39(48.8)	21(52.5)	Ns	nuovo	N=31
3' UTR	9c		1(2)	1(2.3)						31.6	^
		rs9332381									
		C/C	50(100)	44(100)	6(100)	114 (95)	77(96.25)	37(92.5)		96.8	N=31
3' UTR	55521 c>g	C/G	-	-	-	6(5)	3 (3.75)	3(7.5)	Ns	3,2	^
		G/G	-	-	-	-	-	-		-	
		55244c>g									
		C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)			
3' UTR	55244c>g	C/G	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	nuovo	
		G/G	-	-	-	-	-	-			
		55357c>t									
		C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)			
3' UTR	55357c>t	C/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	Ns	nuovo	
		T/T	-	-	-	-	-	-			

\* =HAP MAP; ^= SNP CANCER 500; °= NIH Polymorphism Discovery Resource; § = SeattleSNPs Program for Genomic Applications

° Differenza statisticamente significativa tra TMD e controlli

Ns= non significativi

Nd= non disponibili



**Tab. 2 Frequenze genotipiche dei nuovi polimorfismi del gene COMT nei pazienti TMD e nei controlli**

Localizzazione	SNP	genotipo	TMD, n(%)			Controlli, n(%)			p	
			Totale	Femmine	Uomini	Totale	Femmine	Uomini		
			50	44	6	120	80	40		
p2	26971	GG	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)	ns	
		GA	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-		
		AA	-	-	-	-	-	-		
P2	27390	AA	49(98)	43(97.7)	6(100)	-	-	-	ns	
		A/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-		
		T/T	-	-	-	-	-	-		
p2	27427	G/G	50(100)	44(97.7)	6(100)	119 (99.2)	80(100)	39(97.5)	ns	
		G/T	-	-	-	1 (0.8)	-	1(2.5)		
		T/T	-	-	-	-	-	-		
p2	27780	A/A	50(100)	44(100)	-	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)	ns
		A/G	-	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-	
		G/G	-	-	-	-	-	-	-	
P2	28153	G/G	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	80(100)	39(97.5)	ns	
		G/T	-	-	-	1 (0.8)	-	1(2.5)		
		T/T	-	-	-	-	-	-		
p2	28231	C/C	44(100)	-	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)	ns	
		C/T	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-		
		T/T	-	-	-	-	-	-		
Ex1	28363	G/G	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)	ns	
		G/C	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-		
		C/C	-	-	-	-	-	-		
p1	48612	G/G	10(20)	9(20.5)	1(16.7)	30 (25)	21 (26.25)	9(22.5)	ns	
		G/C	24(48)	20(45.5)	4(66.7)	48 (40)	31 (38.75)	17(42.5)		
		C/C	16(32)	15(34)	1(16.7)	42 (35)	28 (35)	14 (35)		
p1	48621	C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	-	-	-	ns	
		C/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-		
		T/T	-	-	-	-	-	-		
p1	48869	C/C	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	-	ns	
		C/T	-	-	-	1(0.8)	1(1.25)	-		
		T/T	-	-	-	-	-	-		
		C/C	49(98)	45(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)	ns	

EX3	49189	C/A	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	
		A/A	-	-	-	-	-	-	
int3	49559	C/C	48(96)	42(95.5)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)	
		C/T	2(4)	2(4.5)	-	-	-	-	ns
		T/T	-	-	-	-	-	-	
int4	50482	G/G	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	79(98.75)	40(100)	
		G/C	-	-	-	1 (0.8)	1(1.25)	-	ns
		C/C	-	-	-	-	-	-	
int4	50493	G/G	50(100)	44(100)	6(100)	119 (99.2)	80(100)	39(97.5)	
		G/A	-	-	-	1 (0.8)	-	1(2.5)	ns
		A/A	-	-	-	-	-	-	
int4	50648	C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)	
		C/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	ns
		T/T	-	-	-	-	-	-	
3' UTR	55237- 55238insCC		1(2)	43(97.7)	1(2.3)	6(100)	-	-	ns
3' UTR	55244	C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)	
		C/G	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	ns
		G/G	-	-	-	-	-	-	
3' UTR	55357	C/C	49(98)	43(97.7)	6(100)	120(100)	80(100)	40(100)	
		C/T	1(2)	1(2.3)	-	-	-	-	ns
		T/T	-	-	-	-	-	-	

**Tab. 3 Polimorfismi SNPs nel gene COMT associati al TMD**

SNP	Genotipo	TMD, n (%)	Controlli, n (%)	P
		Totale 50	Totale 120	
Localizzazione	ID SNP			
		27774g>a		
		G/G	31(62)	94 (78.3)
p2	rs4646310	G/A	18(36)	21 (17.5)
		A/A	1(2)	5 (4.6)
		47831g>c		
		G/G	13(26)	55 (45.8)
p1	rs165656	G/C	20(40)	51 (42.5)
		C/C	17(34)	14 (11.7)
		47981c>t		
		C/C	13(26)	57 (47.5)
p1	rs165722	C/T	21(42)	45 (37.5)
		T/T	16(32)	18 (15)
		50239g>a		
		G/G	15(30)	52 (43.3)
ex4	rs4680	G/A	20(40)	44 (36.7)
		A/A	15(30)	24 (20)

° Differenza statisticamente significativa all'analisi univariata ( $\chi^2$  test)

^ Differenza statisticamente significativa alla regressione logistica binaria (p=0.001 e 0.011)

§ Differenza statisticamente significativa tra TMD con e senza dolori non cefalgici alla analisi discriminante multinominale (p=0.04)

Vedere testo a pg.38

**Tab.4 SNPs di COMT ed effetto predetto sulla struttura secondaria dell'RNA calcolato mediante mfold\***

localizzazione	Posizione/rs	$\Delta G$ kcal/mol <i>wt versus SNP</i>
P2	28231	-106.13/-112.61
Ex-1	28363	-108.54/-114.20
P1	rs165722	-79.57/-81.29
P1	rs9332361	-64/-71.91
Ex-3	rs4633	-75.29/-77.69
Int-3	rs2239393	-88.44/89.27
Ex-4	rs4818	-81.81/-81.84
3'UTR	rs9332381	-26.02/-34.09

\*<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>.

## **RINGRAZIAMENTI**

Credo che questa sia la parte più complicata della mia tesi, ma di sicuro è la più emozionante, sarò banale, ma le prime persone da ringraziare sono i miei genitori e mio fratello. Chi è votato alla scienza lo è, in parte, anche grazie all'educazione ricevuta, quel senso profondo del dubbio, quella continua necessità di andare avanti, quel fuoco che arde alimentato dalla incessante voglia di mettere tutto in discussione.

Poi ringrazio tutti i miei colleghi che per tanti anni hanno sopportato il mio carattere, a volte forse troppo poco accomodante.

Infine, ringrazio la Prof.ssa Lucia Sacchetti per la *forma mentis* che mi ha inculcato e per i continui e giornalieri incitamenti a migliorarmi, focalizzando e mostrandomi i miei aspetti negativi. Grazie!