

MATERIALI E METODI

1. Pazienti con IBS

Per eseguire l'analisi del polimorfismo 5HTTLPR è stato necessario ottenere campioni di sangue intero o saliva dai quali estrarre il DNA genomico. A tal fine è stata avviata una collaborazione tra la Divisione di Farmacologia e Chemioterapia e l'Unità Operativa di Gastroenterologia (Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa). Presso l'ambulatorio della U.O. di Gastroenterologia sono stati selezionati pazienti affetti da IBS secondo i criteri di Roma II. In occasione della visita di controllo e in concomitanza con l'esecuzione di esami emato-chimici di *routine*, ai pazienti è stato prelevato un campione di sangue intero (5 ml), per mezzo di provette Vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante, o di saliva, mediante l'uso di tamponi sterili Omniswab. I campioni di sangue o saliva sono stati conservati a -20°C fino al momento delle procedure analitiche per l'esame del polimorfismo del SERT.

Sono stati registrati i dati relativi all'età, sesso, origine etnica, diagnosi e fenotipo clinico dell'IBS.

Criteri di inclusione dei pazienti:

1. entrambi i sessi, età ≥ 18 anni
2. diagnosi di IBS secondo i criteri di Roma II
3. anamnesi negativa di interventi di chirurgia addominali (fatta eccezione per appendicectomia)
4. disponibilità alla partecipazione allo studio, espressa mediante sottoscrizione del documento di consenso

2. Volontari sani

Nello studio sono stati arruolati volontari sani allo scopo di confrontare i dati dell'analisi genetica nei pazienti con una popolazione di controllo. I volontari sono stati selezionati tra i dipendenti e studenti dell'Università di Pisa.

Ai volontari è stato prelevato un campione di sangue intero (5 ml), per mezzo di provette Vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante, o di saliva, mediante l'uso di OmniSwab. I campioni di sangue o saliva sono stati conservati a -20°C fino al momento delle procedure analitiche per l'esame del polimorfismo del SERT. I volontari sani sono stati selezionati in modo da essere paragonabili per età, sesso, origine etnica al gruppo dei pazienti.

Criteri di inclusione per i volontari sani:

1. entrambi i sessi, età ≥ 18 anni
2. assenza di condizioni patologiche evidenti all'anamnesi, all'esame obiettivo o documentate da analisi ematochimiche o delle urine
3. anamnesi negativa di interventi di chirurgia addominale (fatta eccezione per appendicectomia)
4. disponibilità alla partecipazione allo studio, espressa mediante sottoscrizione del documento di consenso

3. Valutazione della gravità dei sintomi nei pazienti con IBS

I pazienti sono stati classificati in base alle tre manifestazioni cliniche dell'IBS: predominanza di costipazione (C-IBS), predominanza di diarrea (D-IBS), e alternanza di costipazione e diarrea (A-IBS). La gravità della sintomatologia è stata valutata per mezzo del questionario IBS-SSS (*IBS-severity scoring system*) (Francis et al., 1997) (Figura 3.1). Il questionario

consiste in 5 domande riguardanti la gravità e la frequenza del dolore addominale, la gravità del meteorismo, il grado di soddisfazione delle abitudini intestinali e la qualità di vita, alle quali il paziente è invitato a rispondere. I pazienti danno una stima da 0 a 100 dove 0 indica “per niente” e 100 “molto importante”. I risultati ottenuti da ogni singola domanda vengono sommati per ottenere il valore totale del punteggio: un totale >300 è indice di sintomatologia grave; da 175 a 300 la sintomatologia è di intensità moderata e da 75 a 175 è leggera. Valori <175 indicano una condizione normale.

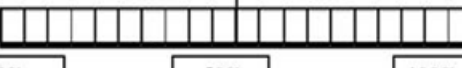
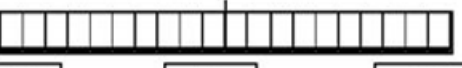
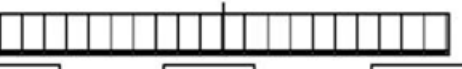
Qual è la gravità del suo dolore addominale?	 0% 50% 100%
Su un periodo di dieci giorni, per quanti giorni ha dolore addominale?	_____ x 10 =
Può quantificare la gravità della distensione addominale?	 0% 50% 100%
Quanto è soddisfatto/a delle sue abitudini intestinali?	 100% 50% 0%
Quanto l'intestino irritabile interferisce e condiziona il suo lavoro e le sue abitudini di vita?	 0% 50% 100%
TOTALE:	

Figura 3.1: Questionario IBS-SSS

4. Procedura per l'estrazione di DNA genomico

I campioni di sangue e saliva sono stati conservati a -20°C fino al momento delle procedure analitiche per l'esame del polimorfismo del SERT. Se l'estrazione di DNA genomico viene effettuata da un campione di saliva, il tampone OmniSwab viene sospeso in 1 ml di soluzione allo 0.9% di NaCl a temperatura ambiente per un'ora, e successivamente sottoposto ad agitazione con Vortex. Il tampone viene poi rimosso dalla soluzione ottenuta e quest'ultima viene centrifugata per 5 minuti a 3000 rpm; il pellet che si ottiene viene risospeso in 200 µl di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) in modo tale da essere utilizzabile per le procedure di estrazione del DNA genomico. Il campione di sangue viene portato a temperatura ambiente e agitato diverse volte.

Il DNA genomico è stato estratto tramite l'uso di un kit QIAamp DNA *blood MINI kit* (Qiagen). Il principio su cui si basa l'estrazione dipende dalla proprietà del DNA di legarsi a supporti inerti. Questi supporti o filtri sono contenuti in colonne e permettono il legame del DNA e l'eliminazione dell'RNA e delle proteine per mezzo di una serie di lavaggi con tamponi appropriati. Il DNA legato al filtro può successivamente essere eluito tramite acqua o tampone contenente Tris-HCl in volume variabile (tampone AE). Per eseguire l'estrazione, a 25 µl di proteinasi K (con attività 600AU/ml), posti sul fondo della provetta, vengono aggiunti 200 µl di sangue intero a temperatura ambiente, o il pellet ottenuto dalla saliva, risospeso in 200 µl di NaCl 0,9%, e 200 µl di tampone di lisi. Successivamente il campione viene incubato a 56°C per 10 minuti. Al termine si aggiungono al campione 200 µl di etanolo al 100% e, dopo averlo trasferito in apposite provette, si centrifuga e si procede ai lavaggi con

due diversi tamponi denominati AW1 e AW2. I tamponi di lavaggio vengono precedentemente diluiti nel seguente modo: 19 ml di AW1 concentrato con 25 ml di etanolo al 100% e 13 ml di AW2 concentrato con 30 ml di etanolo al 100%; conservati a temperatura ambiente per un periodo non superiore a un anno. Infine si procede all'eluizione del DNA genomico con acqua deprivata di enzimi ad azione nucleasica (*DNAase free*) o con apposito tampone di eluizione AE.

La qualità di DNA genomico estratto viene verificata per mezzo di analisi elettroforetica in gel di agarosio all'1%. Una volta constatata l'integrità del campione di DNA, questo viene quantificato mediante spettrofotometria e conservato alla temperatura di -20°C fino all'esecuzione delle successive procedure analitiche.

5. Determinazione del polimorfismo 5HTTLPR

La presenza del polimorfismo 5HTTLPR è stata determinata mediante analisi *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sono stati disegnati oligonucleotidi specifici (*primers*) per amplificare le regioni di DNA genomico contenenti le varianti *short* (S) e *long* (L). I primers disegnati per tale scopo sono i seguenti:

- LPR-F: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3' senso, corrispondente alla posizione nucleotidica che va da -1416 a -1397 all'estremità 5' della regione *promoter* del gene *SERT*;
- LPR-R: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3' antisenso, corrispondente alla posizione nucleotidica che va da -910 a -888 all'estremità 5' della regione *promoter* del gene *SERT*.

La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 50 μ l contenente i seguenti reattivi: 1 μ l di DNA genomico, 25 μ l di acqua *DNAase free*, 1 μ l di dNTP 10 mM, 1 μ l di *primer* LPR-F 10 mM, 1 μ l di *primer* LPR-R 10 mM, 10 μ l di BUFFER GC resolution, 10 μ l di BUFFER 5x DMSO e 1 μ l di enzima AmpliTaq polimerasi (ROCHE Diagnostics). La reazione è stata condotta in un *thermocycler PCR DNA engine* (BIO-RAD) sulla base del seguente protocollo di amplificazione:

1. Denaturazione iniziale del DNA genomico a 94°C per 3 minuti;
 2. Denaturazione a 94° per 1 minuto;
 3. Annealing a 55°C per 1 minuto;
 4. Estensione a 72°C per 1 minuto;
 5. Estensione finale a 72°C per 7 minuti.
- 30 cicli

6. Separazione elettroforetica per la determinazione dei prodotti di PCR

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati tramite separazione elettroforetica del DNA in gel di agarosio al 2% in tampone TAE 1X (TAE 10X: 48,4 g di Tris base in 800 ml di acqua distillata, 11,42 ml di acido acetico glaciale, 20 ml di EDTA 0,5 M portati ad un volume finale di 1 litro con acqua distillata autoclavata) contenente 3,5 μ l di etidio bromuro (10 mg/ml). Si preparano miscele contenenti 2 μ l di colorante per DNA e 15 μ l di prodotto di amplificazione, e si introducono le singole miscele nei pozzetti del gel. Si procede quindi alla separazione elettroforetica che viene eseguita per mezzo di una apparecchiatura Easy Cast (Genenco Milano, Italia) applicando una

differenza di potenziale di 70 V per circa 150 minuti. Le bande relative ai prodotti di PCR vengono visualizzate alla luce ultravioletta e l'immagine viene acquisita mediante apparecchiatura Kodak Image Station 440.

7. Analisi statistica

Dopo aver effettuato la genotipizzazione dei pazienti e dei volontari sani i dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica. L'analisi statistica è stata condotta in collaborazione con il Dott. Giuseppe Rossi (Sezione di Epidemiologia e Biostatistica dell'Istituto di Fisiologia Clinica, C.N.R, Pisa). Le differenze tra le frequenze genotipiche dei pazienti e dei volontari sani sono state analizzate tramite il test di Pearson e di Fisher. Le differenze tra i risultati ottenuti con il questionario IBS-SSS e la distribuzione dei genotipi sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA). In tutte le analisi statistiche è stato considerato un livello di significatività pari a $P < 0.05$.