



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento Struttura Clinica Medica – Patologia Speciale Medica

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche  
Direttore Prof. E. Tolu  
Indirizzo di Fisiopatologia Medica  
XXII ciclo

Tesi finale di Dottorato

**“Aplotipi del sistema beta-adrenergico e risposta ai beta-  
bloccanti”**

**Direttore della Scuola:**

**Prof. Eusebio Tolu**

Coordinatore:

*Prof. Nicola Glorioso*

Relatore:

*Prof. Nicola Glorioso*

Correlatore:

*Dr.ssa Fabiana Filigheddu*

Dottorando:

Dr.ssa Frau Francesca

Anno Accademico 2008/2009

## INDICE

Sommario	pag. 1
Introduzione	pag. 2
Scopo dello studio	pag. 5
Materiali e Metodi	pag. 6
Risultati	pag. 10
Discussione	pag. 12
Bibliografia	pag. 15
Tabelle	pag. 24

## Sommario

**Introduzione:** l'associazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del sistema adrenergico con l'ipertensione arteriosa essenziale (IA) e con la risposta antiipertensiva ai beta-bloccanti rimane incerta e dibattuta. Gli studi basati sugli aplotipi consentono di analizzare l'effetto combinato di più SNPs e aumentano l'informatività degli studi di associazione. Lo scopo del nostro studio è stato, pertanto, di analizzare l'associazione degli aplotipi del sistema adrenergico con l'IA e con la risposta pressoria alla terapia con atenololo. **Materiali e Metodi:** 1112 pazienti ipertesi mai trattati e 203 normotesi sono stati sottoposti ad analisi genetica: 8 SNPs in linkage disequilibrium, appartenenti ai geni codificanti per il recettore adrenergico beta1 (Ser49Gly e Arg389Gly), beta2(Cys19Arg, Gly16Arg e Gln27Glu) e la sub-unità beta della proteina G (A3882C, G5249A e C825T) sono stati genotipizzati tramite PCR, seguita da RFLP o Realtime Taq-Man PCR. In un sottogruppo di pazienti ipertesi (n=340) è stata inoltre valutata l'associazione degli aplotipi con la IA e con la risposta pressoria ad atenololo 50 mg 2 volte al dì (Haploview 3.2, Stata 9.0). **Risultati:** nell'intera coorte i singoli SNPs non erano associati con l'IA né con la risposta pressoria; nelle sole femmine gli SNPs e gli aplotipi della proteina G erano associati con la risposta alla terapia ( $p < 0.05$ ). **Conclusioni:** il nostro studio conferma l'associazione sesso-specifica dei polimorfismi della proteina G con la risposta pressoria all'atenololo. Nessun vantaggio sostanziale è emerso dall'analisi degli aplotipi rispetto a quella fondata sui singoli SNPs.

## Introduzione

L'ipertensione arteriosa (IA) e' una patologia a larga diffusione in Italia e nel mondo, con una prevalenza del 30% circa nella popolazione generale e fino al 75% nella fascia di eta' dai 70 anni in su [1]. L'IA e' una malattia complessa: essa deriva, infatti, dall'insieme di fattori genetici predisponenti e fattori ambientali "scatenanti" la malattia [2-3]. L'incremento dei valori di pressione arteriosa oltre il limite di normalita' (>140/90 mmHg) si associa ad un aumentato rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, come dimostrato da studi osservazionali di lunga durata su coorti di ampie dimensioni [4]. La normalizzazione della pressione arteriosa, sia essa ottenuta con la correzione dello stile di vita o con i farmaci, si accompagna alla riduzione di tale rischio, ma non alla sua scomparsa. La protezione cardiovascolare, inoltre, varia a seconda del distretto interessato, essendo significativa per il distretto cerebrale, meno rilevante per quello renale e non clinicamente significativa per quello cardiaco [5].

Circa il 30-40% dei pazienti trattati con una delle principali classi di farmaci antiipertensivi in monoterapia vede la sua pressione arteriosa normalizzata (<140/90 mmHg) [6]: tuttavia, la risposta antiipertensiva non e' predicibile sulla base di dati clinici, di laboratorio o strumentali, pertanto la scelta di una determinata molecola nel paziente iperteso, se non guidata da precise indicazioni in presenza di comorbidita', e' assolutamente casuale. La riduzione dei valori della pressione arteriosa sotto terapia, infatti, dipende anch'essa da numerosi meccanismi in gran parte ignoti, alcuni dei quali sicuramente genetici [7]. E' stato stimato che la componente genetica corrisponde al 20-95% della variabilita' dell'effetto farmacologico [8].

La farmacogenomica e' lo studio dell'effetto dei geni sulla risposta ai farmaci [9]: essa e' pertanto un tratto complesso, che riconosce una base poligenica e numerosi altri fattori, in gran parte non ancora identificati.

Numerosi studi di associazione tra polimorfismi genetici e l'IA o la risposta antiipertensiva alla terapia sono stati riportati in letteratura [10], ma l'individuazione di polimorfismi coinvolti nella loro patogenesi spesso non e' stata confermata. Tra i motivi per cui tali risultati siano stati spesso

contrastanti riteniamo opportuno citare le piccole dimensioni dei campioni analizzati, la imprecisa applicazione della diagnostica, con erronea selezione dei casi e dei controlli, l'analisi di parametri biologici senza adeguato wash-out farmacologico. Infine, spesso la scelta dei geni da analizzare e' stata obiettivamente casuale, senza un serio razionale che permettesse di legare da un punto di vista fisiopatologico il polimorfismo genetico con il fenotipo. Sarebbe auspicabile, infatti, lo studio dell'associazione di un polimorfismo genetico codificante per una proteina (sia essa un enzima, un recettore, o un trasportatore di membrana) coinvolta in un determinato sistema regolatore con l'IA e con la risposta antiipertensiva ad un farmaco che, coerentemente, agisca su quel determinato meccanismo [11].

Il sistema adrenergico e' uno dei maggiori regolatori della pressione arteriosa (PA) nell'uomo: recettori adrenergici sono localizzati nei vasi, di cui inducono costrizione (recettori alfa1) o dilatazione (recettori beta2); essi sono anche presenti nel cuore (recettori beta1) e la loro stimolazione regola la frequenza cardiaca, l'eccitabilita' e l'inotropismo. L'attivazione dei recettori adrenergici beta1 situati nelle cellule juxtaglomerulari, invece, attiva il sistema renina-angiotensina-aldosterone, anch'esso deputato al controllo della pressione arteriosa. Oltre ai recettori adrenergici, anche le proteine G sono coinvolte nella regolazione della pressione arteriosa modulando, con attivita' stimolatoria o inibitoria, l'effetto dei recettori adrenergici a cui sono accoppiati. Per i motivi sopra elencati i geni codificanti i recettori adrenergici e le proteine G sono logici geni candidati per lo studio dell'IA e della farmacogenomica dei beta-bloccanti. L'associazione di varianti genetiche singole dei recettori adrenergici e delle proteine G con l'IA o con la risposta antiipertensiva ai beta-bloccanti e' stata riportata dal nostro gruppo e da altri gruppi di Ricerca, con risultati contrastanti [12-17].

Uno dei limiti di tali studi potrebbe essere il fatto di aver analizzato polimorfismi genetici a singolo nucleotide (SNP) cioe' mutazioni a carico di un nucleotide che si traducono o meno in modificazioni aminoacidiche. Negli ultimi anni, tuttavia, e' emersa l'importanza degli aplotipi negli studi di genetica. Gli aplotipi sono combinazioni di due o piu' SNP situati a breve distanza sullo stesso cromosoma o comunque in 'linkage disequilibrium' tra di loro. Quando due o piu' polimorfismi sono in 'linkage disequilibrium',

determinate combinazioni alleliche sono ereditate piu' frequentemente di altre, con un rapporto diverso rispetto alle leggi mendeliane e cioe' statisticamente differente da quanto atteso per effetto del caso.

Gli studi basati sugli aplotipi sembrano offrire maggiori vantaggi rispetto agli studi basati sugli SNP perche' consentono di misurare l'effetto combinato di diversi polimorfismi su un determinato fenotipo (ad esempio, IA o risposta antiipertensiva) che e' invece poligenicamente determinato: cosi', mentre l'analisi di un singolo SNP con la risposta antiipertensiva potrebbe piu' facilmente portare ad un'eventuale interpretazione errata, l'analisi contemporanea e combinata di piu' SNP consentirebbe di valutare la relazione tra la risultante dei singoli effetti e la risposta antiipertensiva. A differenza dell'analisi di singoli SNP, che piu' probabilmente si accompagna alla identificazione di falsi positivi o falsi negativi, lo studio degli aplotipi aumenta la probabilita' di trovare una "vera" associazione con il fenotipo sotto studio [18-20].

Aplotipi sono stati identificati a carico del recettore adrenergico beta1 (ADRB1) [21], beta2 (ADRB2) [22] e per la subunita' beta della proteina G accoppiata ai recettori adrenergici [23].

L'aplotipo dell'ADRB1 e' stato associato con la risposta antiipertensiva al metoprololo in pazienti con IA non complicata [13], mentre gli aplotipi dell'ADRB2 sono stati studiati in relazione all'IA e ai valori di pressione arteriosa, ma anche in questo caso i risultati ottenuti sono stati contrastanti [22, 24-27], in gran parte per i motivi elencati sopra. Gli aplotipi del sistema adrenergico sono anche stati messi in relazione con le malattie cardiovascolari [24, 26-31] ma anche con la fibromialgia e con i valori di colesterolo LDL e trigliceridi [32-34].

## **Scopo dello studio**

Lo scopo del nostro studio e' stato di esaminare l'associazione di aplotipi del sistema adrenergico con l'IA e con la risposta antiipertensiva ai beta-bloccanti in uno studio caso-controllo e in una coorte di pazienti ipertesi sottoposti a terapia con un beta-bloccante.

## Materiali e metodi

1) Studio caso-controllo: lo studio caso-controllo è stato effettuato a partire da una coorte iniziale di 1557 pazienti, mai trattati, affetti da ipertensione essenziale e 241 controlli normotesi; gli aplotipi dei geni ADRB1, ADRB2 e GNB3 (vedi oltre) sono stati genotipizzati in 1112 ipertesi e 203 normotesi. Queste coorti includevano 462 soggetti già esaminati [12] e 853 nuovi pazienti e soggetti arruolati in accordo con gli stessi criteri già riportati [12].

Sia i pazienti ipertesi che i controlli normotesi erano di razza caucasica, non imparentati tra di loro e provenienti da aree del nord Sardegna riconosciute come geneticamente omogenee [35].

L'insorgenza di ipertensione arteriosa (confermata da valori di  $PA \geq 140/90$  mmHg sia durante che alla fine delle 8 settimane del periodo osservazionale, come media di 3 misurazioni per visita, tramite l'utilizzo di un dispositivo elettronico con bracciate di dimensioni adeguate) doveva precedere il compimento dei 60 anni di età.

I casi erano pazienti ipertesi di nuova diagnosi che non erano mai stati trattati in precedenza con farmaci antiipertensivi o con la dieta o che erano senza terapia da almeno 6 mesi per interruzione spontanea del trattamento antiipertensivo. L'ipertensione arteriosa secondaria, le malattie sistemiche croniche ed importanti eventi acuti sono stati esclusi in accordo con le linee guida internazionali [36]. Anche i pazienti con danno d'organo o sintomi correlati all'ipertensione arteriosa sono stati esclusi.

I normotesi del gruppo di controllo (media di 3 misurazioni di  $PA \leq 135/85$  mmHg in assenza di trattamento antiipertensivo) avevano un'età superiore ai 60 anni senza una storia personale e/o familiare di ipertensione arteriosa o malattie cardiovascolari.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico locale e tutti i pazienti e i soggetti hanno firmato un consenso informato per lo studio e per le analisi genetiche. Il consenso informato è stato ottenuto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki: la firma del paziente è stata ottenuta dal medico in presenza di un testimone dopo una chiara presentazione orale del background, dello scopo e della metodologia dello studio.

2) Studio di farmacogenomica: lo studio di farmacogenomica è stato effettuato alla fine del periodo osservazionale in un sottogruppo della coorte di ipertesi (n=340) che ha assunto atenololo 50mg due volte al dì; la PA è stata monitorata per 8 settimane a intervalli di 2 settimane.

I valori a 4 e 8 settimane sono stati utilizzati per l'analisi in accordo con il nostro precedente protocollo [12].

Per tutti i soggetti in studio sono stati analizzati i seguenti polimorfismi genetici:

- **ADRB1** (10q24-q26): A145G (Ser49Gly), rs1801252  
C1165G (Arg389Gly), rs1801253
- **ADRB2** (5q32-q34): T-47C (Cys19Arg), rs1042711  
G46A (Gly16Arg), rs1042713  
C79G (Gln27Glu), rs1042714
- **GNB3** (12p13): A3882C (intron 9), rs11064426  
G5249A (intron 9), rs2301339  
C825T (Ser550Ser), rs54443.

Il DNA genomico è stato estratto a partire da 10 ml sangue intero e fatto precipitare con etanolo al 99%(Talent Extraction kit, Trieste, Italy).

La genotipizzazione è stata effettuata nei seguenti modi:

1. Il segmento di DNA contenente il polimorfismo C825T è stato amplificato mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) con la seguente metodica:  
Primers:5'-tgaccacttgccaccgrgc-3' e 5'-gcagcagccaggctggc-3'  
(file termico:94°C per 5m seguita da 35 cicli a 94°C per 60s, 67°C per 45s, 72°C per 60s, con un'estensione finale a 72°C per 10m) ed in seguito sottoposto a RFLP mediante enzima di restrizione con la produzione di frammenti più corti (BseDI --Fermentas). File termico :37°C per 15m e 80°C per 5m.
2. il polimorfismo T-47C è stato genotipizzato tramite PCR (primers 5'-CTGAATGAGGCTTCCAGGCGTC-3' e 5'-CGCTCGAACTTGGCAATGGCTG-3' (file termico:94°C per 2m seguita da 40 cicli a 94°C per 40s, 64°C per 40s, 72°C per 50s, con un'estensione finale a 72°C per 5m) e successiva

digestione con MspA1I (New England Biolabs, file termico:37°C per 1h, 65°C per 20m). La discriminazione allelica è stata effettuata in base al numero e alla posizione delle bande ottenute dopo la digestione enzimatica del prodotto della PCR e della corsa elettroforetica (gel di agarosio).

3. Sono stati genotipizzati i polimorfismi G46A , C79G,S49G, R389G, A3882C and G5249A mediante Realtime PCR (Taq-Man ABI Prism 7700): tale metodica e' stata effettuata presso il Laboratorio di Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università di Milano coordinato dal Prof. Daniele Cusi, sotto la responsabilità della Prof.ssa Cristina Barlassina durante un periodo di 40 giorni nel corso dell'ultimo anno di Dottorato. Sono stati utilizzati per ogni campione: 0.2ul di saggio 40X , 4ul di master mix 2x, 0.16 ul di rox 50x, 2 ul di DNA.

La PCR real time è un metodo che, grazie all'uso di una sonda rivelatrice, incrementa significativamente la specificità e permette la quantificazione dei prodotti di amplificazione di DNA. La sonda costruita a partire da uno stampo di RNA possiede un rivelatore di fluorescenza (reporter) ad una estremità ed un attenuatore (quencher) di fluorescenza al lato opposto della sonda. La stretta vicinanza dell'attenuatore (quencher) al rivelatore (reporter) impedisce l'individuazione della propria fluorescenza; una rottura della sonda da parte di un'attività esonucleasica 5'->3' della Taq polimerasi rompe la stretta vicinanza rivelatore-attenuatore e perciò permette l'emissione di fluorescenza non attenuata. Un aumento del prodotto è rilevato dalla sonda reporter ad ogni ciclo di PCR, provocando un proporzionale aumento di fluorescenza, a causa della rottura della sonda e del rilascio del reporter. La discriminazione allelica è avvenuta con l'uso di sonde fluorogeniche (fluorogenic Taqmar® probes on a 7500 Fast Real Time system, Applied Biosystems Foster City CA).

## **Analisi statistica**

Le caratteristiche di base sono state analizzate con StataSE 9.2. Per le variabili distribuite in modo non normale sono state effettuate le trasformazioni matematiche adeguate. Il t-test per campioni indipendenti o il 'Wilcoxon rank sum test' sono stati utilizzati rispettivamente per l'analisi di dati con distribuzione normale e non (tabella 1).

Per testare l'Hardy-Weinberg (HW) equilibrium, il linkage disequilibrium ed eseguire l'analisi di associazione degli SNPs e degli aplotipi con l'ipertensione essenziale come tratto categorico (ipertesi contro normotesi), è stato utilizzato Haploview 3.2.

Per l'analisi di associazione genetica con la risposta pressoria all'atenololo, i valori di PA a 4 e 8 settimane meno i valori basali (delta PA) sono stati valutati come tratto quantitativo (StataSE 9.2).

L'ANOVA è stata utilizzata per l'analisi degli SNPs, mentre il modello di interazione tra loci "between-loci interaction" è stato testato per le analisi aplotipiche (StataSE 9.2) [37].

La fase aplotipica è stata dedotta tramite un algoritmo (standard EM algorithm) basato sulla 'maximum likelihood' [37, 38]. In accordo con il nostro precedente lavoro, il campione è stato inoltre stratificato per sesso [12].

Il potere del nostro studio è stato stimato come il potere di individuare una differenza di 10 mmHg nel delta della PA sistolica o di 5 mmHg nel delta della PA diastolica tra gruppi di genotipi: con un livello di significatività di 0.05, il potere era  $\geq 0.92$  per tutti i genotipi. Un valore di p di 0.05 o inferiore è stato considerato come significativo.

## Risultati

Le caratteristiche di base delle coorti degli ipertesi e dei normotesi sono riportate nella tabella 1.

La differenza significativa nell'età e nei valori di PA era legata ai criteri di selezione delle coorti in studio. L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato rispettato per gli SNPs dei geni ADRB1 e GNB3 ma non per quelli dell'ADRB2 (tabella 2), confermando il nostro precedente riscontro [12]. Per ogni gene gli SNP erano in linkage disequilibrium ( $D'$  tra 0.94 e 0.95).

1) Studio caso-controllo: l'associazione con l'ipertensione essenziale è stata esclusa per tutti gli SNPs in esame (tabella 2). Non è stata trovata nessuna associazione nemmeno dopo aver applicato la stratificazione per sesso. Le frequenze allotipiche e l'associazione con l'IA sono riportate nella tabella 3. Anche in questo caso non è stata trovata nessuna associazione nella coorte combinata né dopo la stratificazione per sesso.

2) Studio di farmacogenomica: la tabella 4 mostra l'associazione tra i genotipi del gene GNB3 con la risposta pressoria all'atenololo come tratto quantitativo: nella coorte combinata (pannello in alto) i soggetti 'wild-type' mostravano una maggiore riduzione della pressione sistolica sia dopo 4 che dopo 8 settimane di trattamento. La riduzione della pressione diastolica invece non è significativamente influenzata dal genotipo. Dopo stratificazione per sesso è stata trovata l'associazione tra il genotipo GNB3 e la risposta pressoria ( $\Delta$ PAS e  $\Delta$ PAD) nelle femmine (pannello in basso) ma non nei maschi ( $p > 0.05$ ).

Quando sono stati analizzati gli allotipi, solo la diminuzione della PAS dopo 4 settimane di trattamento era associata con gli allotipi GNB3 nella coorte combinata, mentre il delta PAS e il delta PAD a 8 settimane non era associato (tabella 5, pannello in alto).

Nelle femmine, l'associazione con gli allotipi della GNB3 con il delta PAS persisteva sia dopo 4 che dopo 8 settimane di terapia, mentre nei maschi l'associazione scompariva (tabella 5, pannello centrale e basso).

I singoli SNPs e gli aplotipi dei geni ADRB1 e ADRB2 non predicevano la risposta pressoria all'atenololo né nella coorte combinata né dopo stratificazione per sesso ( $p > 0.05$ , dati non mostrati).

## Discussione

Nel presente studio abbiamo analizzato pazienti ipertesi mai trattati e controlli normotesi, per determinare l'associazione di alplotipi del sistema adrenergico con l'ipertensione arteriosa essenziale e con la risposta pressoria all'atenololo. Poiché solo pochi dati su questo argomento sono disponibili in letteratura si è deciso di estendere il nostro precedente lavoro, basato su diversi SNPs del sistema adrenergico, agli alplotipi conosciuti dei geni dei recettori adrenergici beta1, beta2 e della G-protein e di incrementare la numerosità delle nostre coorti precedenti.

Nel presente studio nessuno degli SNPs o degli alplotipi era distribuito in maniera differente tra gli ipertesi e i normotesi. In particolare non è stata trovata conferma della nostra precedente scoperta dell'associazione di Gly16Arg (ADRB2) con l'ipertensione arteriosa essenziale, poiché è stata trovata solo un debole e non significativo eccesso di eterozigoti tra i normotesi. Il motivo principale di quest'apparente discrepanza è probabilmente il maggior numero di casi e controlli rispetto al nostro precedente lavoro. Curiosamente, tutti gli SNPs dell' ADRB2 erano in HW disequilibrio.

Si è provato a minimizzare il rischio di errori dovuti alla stratificazione di popolazione e alla genotipizzazione con l'arruolamento dei casi e dei controlli dalle stesse aree geografiche e con un doppio controllo della genotipizzazione. Inoltre l' HW disequilibrio per Gly16Arg e per Gln27Glu era già stato osservato in altre coorti Europee [28].

In questo studio è emersa per la prima volta l'associazione sesso-specifica degli SNPs in linkage disequilibrium con il polimorfismo C825T con la risposta pressoria all'atenololo: nelle femmine, i portatori del wild type mostravano una maggiore riduzione della pressione arteriosa sistolica e diastolica dopo la terapia, mentre gli alplotipi della GNB3 predicevano solamente una diminuzione della pressione arteriosa sistolica. Nei maschi, al contrario, la risposta al trattamento con l'atenololo non cambiava in relazione alle varianti della G-protein. Questo lavoro conferma il ruolo del 'contesto' all'interno delle complesse relazioni tra le varianti genetiche e il fenotipo finale, com' è noto da diversi anni [39].

La nostra precedente ipotesi era che il meccanismo che correla l'allele T825 all'ipertensione, come nell'ipertrofia vascolare [21], agisce di più nelle femmine mentre è inattiva nei maschi.

Poiché le varianti della GNB3 non erano associate con l'ipertensione nel nostro studio, possiamo ipotizzare che il loro effetto sia evidente in un fenotipo "più vicino" (risposta pressoria), mentre può non essere visibile in un fenotipo più lontano (ipertensione arteriosa) a causa dell'interferenza di altri meccanismi, come l'ambiente, il contesto e altri geni [39].

La domanda che scaturisce dal nostro, così come da altri lavori sugli aplotipi, è se l'approccio basato sugli aplotipi aggiunga più informazioni rispetto a quella con semplici SNPs negli studi di associazione e di farmacogenomica: nel nostro caso l'analisi degli aplotipi della GNB3 non ha portato sostanziali vantaggi rispetto a quella effettuata sui singoli SNPs. Infatti l'associazione tra la risposta diastolica con GNB3 spariva completamente con l'analisi degli aplotipi ed il grado di associazione con la caduta della pressione sistolica era ridotto. Diversi studi sulle malattie complesse attribuiscono un valore addizionale agli aplotipi rispetto agli SNPs [17, 28-30]. Al contrario, quando Binder e collaboratori analizzarono la relazione tra i polimorfismi ADRB2 e l'ipertensione arteriosa, l'allele Gln27 da solo mostrò una più forte associazione con la pressione arteriosa diastolica rispetto all'aplotipo contenente il polimorfismo Gln27 [14].

Gli aplotipi del sistema adrenergico sono stati correlati con le malattie cardiovascolari [14, 16, 17, 31-34] con la risposta pressoria [35], ma anche con disordini non cardiovascolari [40-48].

La letteratura sugli aplotipi del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è ricca di studi che descrivono l'associazione con l'ipertensione arteriosa o con la risposta pressoria degli inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone [49-56]. In questo studio abbiamo arruolato pazienti ipertesi mai trattati, che spontaneamente non avessero assunto farmaci antiipertensivi per almeno 6 mesi. Un periodo di 6 mesi è considerato abbastanza lungo da rimuovere completamente l'effetto sulla pressione arteriosa dei precedenti farmaci antiipertensivi [57].

Il disegno di questo studio ha incluso un periodo osservazionale di 8 settimane per confermare i valori pressori elevati ed eseguire i test strumentali e di

laboratorio non invasivi seguiti da un periodo di trattamento di 8 settimane con un beta-bloccante. Tutti questi step sono stati fatti in accordo con le linee guida internazionali [36] che raccomandano di confermare l'ipertensione arteriosa essenziale in 2 o più visite ambulatoriali entro 1-2 mesi nei pazienti ipertesi non complicati.

Anche la durata del trattamento e la scelta di un beta-bloccante come terapia iniziale sono in accordo con le linee guida internazionali.

In questo studio non abbiamo analizzato il "fenotipo intermedio" ipertrofia vascolare, che potrebbe essere responsabile dell'ipertensione arteriosa nei portatori del genotipo T825 [21] e potrebbe aiutare a stabilire una relazione funzionale tra la variante genetica e il fenotipo finale: ciò potrebbe essere certamente considerato un limite del nostro studio. D'altro canto un punto di forza è la scelta di coorti ben definite di ipertesi (con insorgenza prima dei 60 anni, mancanza di trattamento antiipertensivo) e normotesi (più di 60 anni di età, senza storia personale o familiare di ipertensione e malattie cardiovascolari) che provengono da aree del nord Sardegna precedentemente documentate come geneticamente omogenee [35].

Nonostante il "clustering" di questo studio di popolazione, le frequenze alleliche non erano sostanzialmente differenti da quelle riportati per altre coorti di ipertesi e normotesi italiani del continente: di conseguenza i nostri risultati possono essere estesi all'intera popolazione italiana.

Questo studio ha confermato il ruolo del gene GNB3 nella risposta antiipertensiva all'atenololo e l'importanza del sesso nell'analisi genetica dei tratti complessi. Nel nostro caso l'analisi genetica degli aplotipi ha condotto a una piccola differenza nei risultati scientifici se comparata con quelli ottenuti dalla analisi degli SNPs, più semplice ed economica.

## Bibliografia

1. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al.  
Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991.  
Hypertension 1995;25:305-13
2. Lander, E. S.; Schork, N. J. (1994) Genetic dissection of complex traits.  
Science 265, 2037-2048.
3. Camussi A, Bianchi G.  
Genetics of essential hypertension. From the unimodal-bimodal controversy to molecular technology.  
Hypertension. 1988 Dec;12(6):620-8.
4. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB.  
Prediction of coronary heart disease using risk factor categories.  
Circulation 1998;97:1837-47. .
5. Whelton PK. Primary prevention of hypertension: Clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program.  
JAMA 2002;288:1882–8.
6. Meissner, I.; Whisnant, J.P.; Sheps, S.G.; Schwartz, G.L.; O'Fallon, W.M.; Covalt, J.L.; Sicks, J.D.; Bailey, K.R.; Wiebers, D.O.  
Detection and control of high blood pressure in the community: Do we need a wake-up call?  
Hypertension, 1999, 34, 466-471.
7. Evans, W.E.; Relling M.V.  
Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics  
Science, 1999, 286, 487-491.

8. Kalow, W.; Tang, B.K.; Endrenyi, L.  
Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research.  
Pharmacogenetics, 1998,8,283-9
9. Vogel, F. Ergebn.Inn.  
Med. Kinderheilkd. 1959, 12, 52–125
10. Filigheddu F, Troffa C, Glorioso N.  
Pharmacogenomics of essential hypertension: are we going the right way?  
Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2006 Jan;4(1):7-15
11. Filigheddu F, Argiolas G, Troffa C, Glorioso N. Essential Hypertension: translating  
pathophysiology into Pharmacogenomics.  
Current Pharmacogenomics 4, 219-229 (2006).
12. Filigheddu F, Reid JE, Troffa C, et al. Genetic polymorphisms of the beta-adrenergic system: association with essential hypertension and response to beta-blockade.  
Pharmacogenomics J. 4(3),154-60 (2004).
13. Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF.  
Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol.  
Clin Pharmacol Ther. 74(1), 44-52 (2003).
14. Jia H, Hingorani AD, Sharma P, et al. Association of the G(s)alpha gene with essential hypertension and response to beta-blockade.  
Hypertension 34(1),8-14 (1999).

15. Jia H, Sharma P, Hopper R, Dickerson C, Lloyd DD, Brown MJ. Beta2-adrenoceptor gene polymorphisms and blood pressure variations in East Anglian Caucasians. *J. Hypertens.* 18, 687-693 (2000).
16. Kotanko P, Binder A, Tasker J, et al. Essential hypertension in african caribbeans associates with a variant of the beta2-adrenoceptor. *Hypertension* 30, 773-776 (1997).
17. Xie HG, Stein CM, Kim RB, et al. Human beta2-adrenergic receptor polymorphisms: no association with essential hypertension in black or white Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 670-675 (2000).
18. Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol.* 27, 321-33 (2004).
19. Shastry BS. SNPs and haplotypes: genetic markers for disease and drug response. *Int J Mol Med.* 11(3):379-82 (2003).
20. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet.* 29(2):229-32, (2001).
21. Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, et al. Polymorphisms of the beta1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J.* 144(5), 840-6 (2002).
22. Herrmann SM, Nicaud V, Tiret L, et al. Polymorphisms of the beta2-adrenoceptor (ADRB2) gene and essential hypertension: the ECTIM and PEGASE studies. *J Hypertens.* 20(2), 229-35 (2002).

23. Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W.  
G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms.  
*Hypertension* 36(1), 33-41 (2000).
24. Binder A, Garcia E, Wallace C, et al. Haplotypes of the beta-2 adrenergic receptor associate with high diastolic blood pressure in the Caerphilly prospective study.  
*J Hypertens.* 24(3), 471-7 (2006).
25. Bao X, Mills PJ, Rana BK, et al. Interactive effects of common beta2-adrenoceptor haplotypes and age on susceptibility to hypertension and receptor function.  
*Hypertension.* 46(2), 301-7 (2005).
26. Wallerstedt SM, Eriksson AL, Ohlsson C, Hedner T.  
Haplotype association analysis of the polymorphisms Arg16Gly and Gln27Glu of the adrenergic beta2 receptor in a Swedish hypertensive population.  
*J Hum Hypertens.* 19(9), 705-8 (2005).
27. Lee YW, Oh VM, Garcia E, et al. Haplotypes of the beta2-adrenergic receptor gene are associated with essential hypertension in a Singaporean Chinese population.  
*J Hypertens.* 22(11), 2111-6 (2004).
28. Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, et al. Diverse evolutionary histories for beta adrenoceptor genes in humans.  
*Am J Hum Genet.* 85(1), 64-75 (2009).
29. Camussi A, Bianchi G. Genetics of essential hypertension. From the unimodal bimodal controversy to molecular technology.  
*Hypertension.* 12(6), 620-8 (1988).

30. Bhatnagar V, O'Connor DT, Brophy VH, et al. G-protein-coupled receptor kinase 4 polymorphisms and blood pressure response to metoprolol among African Americans: sex-specificity and interactions. *Am J Hypertens.* 22(3) 332-8 (2009).
31. Bianchi G, Staessen JA, Ferrari P. Pharmacogenomics of primary hypertension—the lessons from the past to look toward the future. *Pharmacogenomics* 4, 279–296 (2003).
32. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, et al. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19),10483-8 (2000).
33. Hoehe MR, Köpke K, Wendel B, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet.* 9(19), 2895-908 (2000).
34. Martin ER, Lai EH, Gilbert JR, et al. SNPing away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 67(2), 383-94 (2000).
35. Cappello N, Rendine S, Griffo R, et al. Genetic analysis of Sardinia: I. data on 12 polymorphisms in 21 linguistic domains. *Ann Hum Genet.* 60(pt 2),125–141 (1996).

36. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289(19), 2560-2572 (2003).
37. A. P. Mander AP. Analysis of quantitative traits using regression and log-linear modeling when phase is unknown. *Stata Journal* 2(1), 65-70 (2002).
38. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2), 263-265 (2005).
39. Bianchi G, Manunta P, Glorioso N. Clinical impact of adducin polymorphism. *J Hypertens*. 27(6), 1325-7 (2009).
40. Siffert W, Roskopf D, Siffert G, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet*. 18(1), 45-8 (1998).
41. Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest*. 100(12), 3184-8 (1997).
42. Shin J, Lobbmeyer MT, Gong Y, et al. Relation of b2-adrenoceptor haplotype to risk of death and heart transplantation in patients with heart failure. *Am. J. Cardiol*. 99, 250-255 (2007).

43. Zee RYL, Cook NR, Reynolds R, Cheng S, Ridker PM.  
Haplotype analysis of the b2 adrenergic receptor gene and risk of myocardial infarction in humans.  
*Genetics* 169, 1583–1587 (2005).
44. Li B, Ge D, Wang Y, et al. G protein beta 3 subunit gene variants and essential hypertension in the northern Chinese Han population.  
*Ann Hum Genet.* 69(Pt 4), 468-73 (2005).
45. Pacanowski MA, Gong Y, Cooper-Dehoff RM, et al. Beta-adrenergic receptor gene polymorphisms and beta-blocker treatment outcomes in hypertension.  
*Clin Pharmacol Ther.* 84(6), 715-21 (2008).
46. Bhatnagar V, O'Connor DT, Brophy VH, et al. G-protein-coupled receptor kinase 4 polymorphisms and blood pressure response to metoprolol among African Americans: sex-specificity and interactions.  
*Am J Hypertens.* 22(3), 332-8 (2009).
47. Petrone A, Zavarella S, Iacobellis G, et al. Association of beta2 adrenergic receptor polymorphisms and related haplotypes with triglyceride and LDL-cholesterol levels.  
*Eur J Hum Genet.* 14(1), 94-100 (2006).
48. Vargas-Alarcón G, Fragoso JM, Cruz-Robles D, et al. Association of adrenergic receptor gene polymorphisms with different fibromyalgia syndrome domains.  
*Arthritis Rheum.* 60(7), 2169-73 (2009).
49. Watkins WS, Hunt SC, Williams GH, et al. Genotype-phenotype analysis of angiotensinogen polymorphisms and essential hypertension: the importance of haplotypes.  
*J Hypertens.* Sep 16 (2009).

50. Niu W, Qi Y, Hou S, Zhai X, Zhou W, Qiu C. Haplotype-based association of the renin-angiotensin-aldosterone system genes polymorphisms with essential hypertension among Han Chinese: the Fangshan study.  
J Hypertens. 27(7), 1384-91 (2009)
51. Mansego ML, Redon J, Marin R, et al. Renin polymorphisms and haplotypes are associated with blood pressure levels and hypertension risk in postmenopausal women.  
J Hypertens. 26(2), 230-7 (2008).
52. Liu H, Zhang S, Jiang S, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and antihypertensive response to irbesartan in Chinese hypertensives.  
Methods Find Exp Clin Pharmacol. 30(4), 307-12 (2008).
53. Su X, Lee L, Li X, et al. Association between angiotensinogen, angiotensin II receptor genes, and blood pressure response to an angiotensin-converting enzyme inhibitor.  
Circulation 115(6), 725-32 (2007).
54. Forleo C, Sorrentino S, Guida P et al. Beta1- and beta2-adrenergic receptor polymorphisms affect susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy.  
J Cardiovasc Med (Hagerstown). 8(8), 589-95 (2007).
55. Iacoviello M, Forleo C, Sorrentino S et al. Alpha- and beta-adrenergic receptor polymorphisms in hypertensive and normotensive offspring.  
J Cardiovasc Med (Hagerstown) 7(5), 316-21 (2006).
56. Pinelli M, Giacchetti M, Acquaviva F et al. Beta2-adrenergic receptor and UCP3 variants modulate the relationship between age and type 2 diabetes mellitus.  
BMC Med Genet. 7, 85 (2006).

57. Medical Research Council Working Party on Mild Hypertension. Course of blood pressure in mild hypertensives after withdrawal of long term antihypertensive treatment.

Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 293, 988-992 (1986)

<b>IPERTESI</b>	<b>NORMOTESI</b>	
n	1112	203
eta' (anni)	51 (IQR 44-58)	66 (IQR 62-70)*
sesto (F/M)	499/613	106/97
PAS (mmHg)	159 (95%CI 157-160)	127 (IQR 120-130)*
PAD (mmHg)	106 (95%CI 105-107)	80 (IQR 70-80)*
BMI	27 (IQR 25-30)	26 (IQR 24-29)*
fumo (si'/no)	202/910	35/168

**Tabella 1:** caratteristiche di base dei pazienti ipertesi e dei controlli normotesi

HT:ipertesi, NT: normotesi, PAS:pressione arteriosa sistolica, PAD: pressione arteriosa diastolica, BMI: indice di massa corporea. I dati sono espressi come mediana e range interquartile (IQR) o come media e intervallo di confidenza del 95% (CI). \* p<0.05.

GENE	SNP	Amino acido	refSNP	posizione	allele minore	HW (p)	MAF	$\chi^2$	p
ADRB1	A145G	Ser49Gly	rs1801252	115794026	G	0.86	0.12	1.04	0.31
	C1165G	Arg389Gly	rs1801253	115795046	G	0.11	0.27	0.44	0.51
ADRB2	T-47C	Cys19Arg	rs1042711	148186541	C	<0.001	0.20	0.51	0.47
	G46A	Gly16Arg	rs1042713	148186633	A	0.002	0.42	0.25	0.62
	C79G	Gln27Glu	rs1042714	148186666	G	0.02	0.32	2.06	0.15
GNB3	A3882C	intron 9	rs11064426	6823518	C	0.37	0.30	0.30	0.59
	G5249A	intron 9	rs2301339	6824885	A	0.77	0.29	0.004	0.95
	C825T	Ser5500Ser	rs5443	6825136	T	0.69	0.28	1.22	0.27

Tabella 2: dettagli dei polimorfismi dei geni ADRB1, ADRB2 e GNB3 e analisi di associazione con l'ipertensione arteriosa ( $\chi^2$ , p-value) per la coorte totale (maschi e femmine).

HW: Hardy-Weinberg; SNP: polimorfismo di un singolo nucleotide; MAF: frequenza dell'allele minore.

<b>GENE (SNPs)</b>	<b>aplotipo</b>	<b>frequenza (%)</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p</b>
ADRB1 (A145G, C1165G)	AC	0.61	0.001	0.98
	AG	0.27	0.53	0.46
	GC	0.12	1.26	0.26
ADRB2 (T-47C, G46A, C79G)	TAC	0.37	0.69	0.40
	TGC	0.31	0.44	0.51
	CGG	0.18	0.40	0.53
	TGG	0.09	1.08	0.30
	TAG	0.03	0.65	0.42
	CAG	0.01	0.44	0.51
GNB3 (A3882C, G5249A, C825T)	AGC	0.68	0.02	0.90
	CAT	0.27	0.39	0.53
	CGC	0.03	0.02	0.88

Tabella 3: analisi di associazione degli aplotipi essenziale dell'intera coorte (maschi e femmine) con l'ipertensione arteriosa essenziale.

COORTE COMBINATA	$\Delta$ PAS4		$\Delta$ PAD4		$\Delta$ PAS8		$\Delta$ PAD8	
	media $\pm$ DS	p	media $\pm$ DS	p	media $\pm$ DS	p	media $\pm$ DS	p
C825C (n=160)	-26.2 $\pm$ 17.8		-18.7 $\pm$ 11.1		-26.3 $\pm$ 19.1		-19.5 $\pm$ 11.7	
C825T (n=134)	-20.3 $\pm$ 17.9*		-17.1 $\pm$ 11.7		-20.9 $\pm$ 17.0		-16.7 $\pm$ 11.6	
T825T (n=28)	-18.0 $\pm$ 18.5	0.008	-15.5 $\pm$ 11.2	0.21	-13.4 $\pm$ 17.7*	0.002	-15.3 $\pm$ 11.9	0.10
A3882A (n=149)	-26.1 $\pm$ 17.3		-18.6 $\pm$ 11.4		-26.4 $\pm$ 18.4		-19.7 $\pm$ 11.8	
A3882C (n=136)	-21.2 $\pm$ 18.4		-17.1 $\pm$ 11.3		-21.5 $\pm$ 18.0		-16.3 $\pm$ 11.1	
C3882C (n=30)	-15.1 $\pm$ 18.4*	0.004	-15.0 $\pm$ 11.1	0.38	-12.4 $\pm$ 17.3*	0.001	-15.4 $\pm$ 11.7	0.08
G5249G (n=153)	-26.5 $\pm$ 18.1		-18.7 $\pm$ 11.5		-27.0 $\pm$ 19.1		-19.6 $\pm$ 11.8	
G5249A (n=128)	-20.5 $\pm$ 18.3*		-17.1 $\pm$ 11.8		-20.5 $\pm$ 17.2*		-16.3 $\pm$ 11.3	
A5249A (n=29)	-16.6 $\pm$ 16.6*	0.003	-15.6 $\pm$ 10.9	0.43	-12.4 $\pm$ 17.3*	<0.001	-15.4 $\pm$ 11.7	0.09

FEMMINE	$\Delta$ PAS4		$\Delta$ PAD4		$\Delta$ PAS8		$\Delta$ PAD8	
	media $\pm$ DS	p	media $\pm$ DS	p	media $\pm$ DS	p	media $\pm$ DS	p
C825C (n=74)	-32.4 $\pm$ 18.4		-23.2 $\pm$ 10.6		-32.0 $\pm$ 17.9		-21.7 $\pm$ 10.0	
C825T (n=63)	-22.3 $\pm$ 17.6*		-18.5 $\pm$ 12.1		-22.2 $\pm$ 17.1*		-16.8 $\pm$ 11.1	
T825T (n=12)	-13.2 $\pm$ 16.0*	<0.001	-13.8 $\pm$ 10.2*	0.001	-8.5 $\pm$ 15.2*	<0.001	-12.4 $\pm$ 13.0*	0.005
A3882A (n=70)	-32.2 $\pm$ 17.3		-23.2 $\pm$ 10.7		-31.2 $\pm$ 16.7		-21.8 $\pm$ 10.1	
A3882C (n=67)	-23.0 $\pm$ 19.2*		-18.5 $\pm$ 11.9		-23.7 $\pm$ 19.1*		-17.2 $\pm$ 10.9	
C3882C (n=13)	-13.3 $\pm$ 15.3*	<0.001	-14.4 $\pm$ 10.0*	0.004	-8.6 $\pm$ 14.6*	<0.001	-12.8 $\pm$ 12.6*	0.004
G5249G (n=72)	-33.1 $\pm$ 17.7		-23.2 $\pm$ 10.6		-32.6 $\pm$ 17.5		-21.8 $\pm$ 10.0	
G5249A (n=62)	-22.6 $\pm$ 17.6*		-18.6 $\pm$ 12.2		-21.9 $\pm$ 17.7*		-17.0 $\pm$ 11.0	
A5249A (n=13)	-13.3 $\pm$ 15.3*	<0.001	-14.4 $\pm$ 10.0*	0.003	-8.6 $\pm$ 14.6*	<0.001	-12.8 $\pm$ 12.6*	0.004

Tabella 4. Analisi di associazione degli SNPs del GNB3 con la pressione sistolica e diastolica dopo il trattamento con l'atenololo ( $\Delta$ PAS and  $\Delta$ PAD). I dati a 4 e a 8 settimane sono riportati per la coorte combinata (maschi e femmine) nel pannello in alto e per le sole femmine nel pannello in basso.  $p < 0.05$  vs wild-type (correzione Bonferroni).

Francesca Frau, "Aplotipi del sistema beta-adrenergico e risposta ai beta-bloccanti",  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche, indirizzo in Fisiopatologia Medica,  
Università degli studi di Sassari

<b>COORTE COMBINATA</b>	<b><math>\Delta</math>PAS4</b>	<b><math>\Delta</math>PAD4</b>	<b><math>\Delta</math>PAS8</b>	<b><math>\Delta</math>PAD8</b>
<b>APLOTIPI</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
ADRB1 (A145G, C1165G)	0.88	0.95	0.83	0.91
ADRB2 (T-47C, G46A, C79G)	0.29	0.26	0.42	0.60
GNB3 (A3882C, G5249A, C825T)	0.01	0.92	0.07	0.76

<b>FEMMINE</b>	<b><math>\Delta</math>PAS4</b>	<b><math>\Delta</math>PAD4</b>	<b><math>\Delta</math>PAS8</b>	<b><math>\Delta</math>PAD8</b>
<b>APLOTIPI</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
ADRB1 (A145G, C1165G)	0.83	0.79	0.98	0.96
ADRB2 (T-47C, G46A, C79G)	0.38	0.09	0.32	0.38
GNB3 (A3882C, G5249A, C825T)	0.02	0.52	0.002	0.44

<b>MASCHI</b>	<b><math>\Delta</math>PAS4</b>	<b><math>\Delta</math>PAD4</b>	<b><math>\Delta</math>PAS8</b>	<b><math>\Delta</math>PAD8</b>
<b>APLOTIPI</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
ADRB1 (A145G, C1165G)	0.85	0.97	0.52	0.72
ADRB2 (T-47C, G46A, C79G)	0.78	0.96	0.68	0.68
GNB3 (A3882C, G5249A, C825T)	0.17	0.94	0.99	0.98

Tabella 5: analisi di associazione degli aplotipi con la risposta antiipertensiva (sistolica e diastolica,  $\Delta$ PAS e  $\Delta$ PAD) dopo 4 e 8 settimane di terapia con atenololo. Pannello superiore: coorte combinata, pannello centrale: femmine, pannello inferiore: maschi.

## Ringraziamenti

Con GRANDE AFFETTO ringrazio il Prof. Nicola Glorioso che in questi anni mi trasmesso tanto non solo dal punto di vista lavorativo ma anche umano.

Ringrazio inoltre i miei FANTASTICI colleghi: Roberta , Silvia, Emanuela, Wanda, Patrizia, Giuseppe, Chiara , Simona, Fabiana, Federico, Simone, Claudia, Siria, Franceschina, per avermi sopportato e aiutato in tutto questo tempo.

Ringrazio inoltre mia mamma e mio fratello per avermi sostenuto.