



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Corso di dottorato in NEUROSCIENZE

Ciclo XXX

Valutazione dell'espressione del gene TERT e della lunghezza dei telomeri dei leucociti in pazienti affetti da cefalea a grappolo

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14

Presentata da	Dott.ssa Arianna Deidda
Coordinatore Dottorato	Prof. Antonio Argiolas
Tutor	Prof.ssa Maria Del Zompo

Esame finale anno accademico 2016 – 2017
Tesi discussa nella sessione d'esame Marzo 2018

INDICE

Abstract	2
1 Introduzione	4
1.1 La cefalea a grappolo (CG)	4
a) epidemiologia e clinica	4
b) terapia di profilassi con litio	6
c) meccanismo d'azione del litio	9
d) eziopatogenesi e basi genetiche	11
1.2 Dinamica dei telomeri	14
1.3 Correlazione tra lunghezza dei telomeri e dolore	17
1.4 Correlazione tra lunghezza dei telomeri e cefalee primarie	19
1.5 Effetto del litio sulla lunghezza dei telomeri	20
2 Scopo	22
3 Materiali e metodi	23
3.1 Campione	23
3.2 Metodiche di laboratorio	25
a) Misurazione dei livelli di espressione del gene TERT	25
b) Isolamento e valutazione quali-quantitativa del DNA	25
c) Valutazione della lunghezza media dei telomeri	25
d) Allestimento delle reazioni	28
e) Profili termici e cicli di amplificazione	29
3.3 Analisi statistiche	29
a) Livelli di espressione gene TERT	29
b) Valutazione lunghezza dei telomeri dei leucociti	29
4 Risultati	31
4.1 Espressione differenziale del gene TERT nei pazienti con CG	31
4.2 Valutazione lunghezza dei telomeri dei leucociti	31
5 Discussione	35
6 Conclusioni	37
7 Bibliografia	38

ABSTRACT

Introduzione

La cefalea a grappolo (CG) è una rara forma di cefalea primaria, che si manifesta con attacchi di dolore lancinante, orbitario e unilaterale, della durata di 15- 180 minuti, associato a sintomi autonomici trigeminali omolaterali. Sebbene siano state avanzate diverse ipotesi, la patogenesi della CG non è ancora del tutto chiara. Un recente studio di espressione genica ha suggerito un potenziale ruolo del complesso della telomerasi (Eising et al., 2017), enzima che contrasta l'accorciamento dei telomeri, strutture localizzate alle estremità dei cromosomi eucariotici, che conferiscono stabilità e permettono la replicazione completa della doppia elica. È stato suggerito che la lunghezza dei telomeri leucocitari (LTL) possa rappresentare un indicatore molecolare delle conseguenze biologiche dello stress e del dolore (Sibille et al., 2012). Inoltre, un accorciamento accelerato dei telomeri leucocitari è stato osservato nell'emicrania (Ren et al., 2010), altra forma di cefalea primaria. Il litio, stabilizzante del tono dell'umore, è una delle terapie di profilassi indicata per il trattamento della CG. L'effetto differenziale del litio sulla modulazione dell'espressione del gene TERT, che codifica per la subunità catalitica dell'enzima telomerasi, è stato evidenziato su linee cellulari umane (Squassina et al., 2016) e su ratti (Wei et al., 2015). È stato inoltre evidenziato un effetto protettivo del litio nei confronti dell'accorciamento della lunghezza dei telomeri, nel ratto (Wei et al., 2015) e in pazienti affetti da disturbo bipolare (Martinsson et al., 2013;; Squassina et al., 2016).

Obiettivi

Sulla base di queste premesse, gli obiettivi dello studio sono stati: 1) valutare se vi siano differenze nei livelli di espressione del gene TERT in linfoblasti derivati da pazienti affetti da CG rispetto ai controlli sani; 2) valutare l'effetto del litio sui livelli di espressione del gene TERT nello stesso campione di pazienti affetti da CG e nel campione dei controlli sani; 3) valutare, in un campione più esteso, se vi siano differenze nella LTL tra pazienti affetti da CG e controlli sani.

Materiali e metodi

La valutazione dei livelli di espressione del gene TERT è stata condotta sul dataset ottenuto tramite il nostro precedente studio di trascrittomica (Squassina et al., 2013; Costa et al., 2015). Il campione ha incluso 8 pazienti con CG episodica e 10 controlli sani. I livelli di espressione genome-wide sono stati ottenuti tramite microarray GeneChip Human Gene ST 1.0 (Affymetrix, USA) su RNA estratto da cellule linfoblastoidi. Per ogni soggetto, la coltura linfoblastoide era stata divisa in due aliquote, delle quali una è stata trattata con LiCl 1 mM per 7 giorni, mentre l'altra è stata mantenuta in coltura per 7 giorni in terreno non addizionato di LiCl.

La LTL è stata valutata su un campione esteso di 51 pazienti affetti da CG e 100 controlli sani. La valutazione quali-quantitativa del DNA estratto è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica. La valutazione della LTL è stata effettuata su DNA genomico utilizzando la tecnica della PCR Real Time Quantitativa (QPCR), messa a punto da Cawthon (2002), il cui protocollo è stato modificato nel nostro laboratorio.

Risultati

Lo studio ha evidenziato una ridotta espressione del gene TERT nei pazienti con CG rispetto ai controlli sani [Fold change (FC) = 0,82, $p = 0,006$]. Inoltre, il trattamento in vitro con litio è risultato aumentare i livelli di espressione del gene TERT nei pazienti affetti da CG (FC = 1,12, $p = 0,042$) ma non nei controlli (FC = 0,93, $p = 0,11$). Lo studio non ha mostrato differenze significative nella LTL tra i due gruppi, nel campione esteso.

Conclusioni

I risultati dello studio di espressione del gene TERT supportano l'ipotesi di un potenziale coinvolgimento del complesso della telomerasi nella patogenesi della CG, e confermano le precedenti evidenze di un effetto differenziale del litio sulla modulazione dell'espressione di tale gene. Tuttavia, i risultati dello studio della LTL suggeriscono l'assenza di differenze significative nella LTL tra pazienti affetti da CG e controlli. Si rendono necessari ulteriori studi per meglio comprendere il ruolo di alterazioni nella dinamica dei telomeri nella patogenesi della CG e nel meccanismo d'azione del litio.

1. INTRODUZIONE

1.1 La Cefalea a grappolo

Secondo la classificazione dell'*International Headache Society* (IHS) la CG è una forma di cefalea primaria inserita nel capitolo delle cefalalgie autonomico-trigeminali (TACs), caratterizzate da episodi di cefalea associata a sintomi che derivano dal coinvolgimento del sistema parasimpatico cranico. In accordo con la stessa classificazione, si distinguono due diverse forme del disturbo, la CG episodica e la CG cronica (IHS, 2013).

La denominazione italiana cefalea a grappolo (CG) deriva dalla traduzione letterale di "cluster headache", dizione introdotta per la prima volta nel 1952 dall'americano Kunkle (Kunkle, 1952) che intendeva sottolineare, con il termine cluster, una delle caratteristiche peculiari di questa forma di cefalea: il ricorrere degli attacchi "a grappoli". La CG era però certamente nota già negli anni '30, quando Horton l'aveva molto ben descritta su ampie casistiche e forse ancor prima, sotto diverse denominazioni, tra cui "cefalea da suicidio" (Dodick, 2000).

a) Epidemiologia e clinica

La prevalenza della CG è inferiore all'1% nella popolazione generale. Secondo uno studio epidemiologico europeo i valori sono dello 0,2-0,3% (Stovner, 2010). La prevalenza *lifetime* è pari a 124 per 100.000 (Intervallo di Confidenza: IC 101, 151). Il rapporto tra forma episodica e forma cronica è di circa 6:1. (Fischer, 2008).

La CG predomina nettamente nel sesso maschile. Il rapporto maschi femmine varia a seconda degli studi da a 2.5:1 a 7.1:1 (Sjaastad, 2003). In una meta-analisi il rapporto M:F è 4,3:1 ed è più elevato nella forma cronica rispetto a quella episodica (15:1 vs 3,8:1) (Fischer, 2008).

L'età media d'esordio della CG è intorno ai 29-30 anni, ma è possibile un esordio dopo i 50 anni e seppur raramente un esordio nell'infanzia (Ekblom, 2002).

La CG si manifesta, in accordo ai criteri classificativi dell'IHS (tabella 1) con attacchi caratterizzati da dolore intenso e lancinante, strettamente unilaterale, orbitario, sovraorbitario, temporale, o in varie combinazioni di tali sedi, della durata di 15- 180 minuti. Il dolore si associa a uno o più dei seguenti segni omolaterali alla sede del dolore: iniezione congiuntivale, lacrimazione, congestione nasale, rinorrea, sudorazione, miosi, ptosi, edema palpebrale, sensazione di orecchio pieno. Molti pazienti sono irrequieti o agitati durante l'attacco, che si presenta con una frequenza variabile da una volta ogni due giorni a 8 volte al giorno (IHS, 2013).

Vengono distinte una forma episodica, della quale soffrono circa l'85% dei pazienti affetti da CG, e una forma cronica (Dodick, 2000). Nella sua forma più comune, la CG **episodica**, i pazienti affetti presentano periodi di attacchi (definiti "grappoli", "periodi attivi" o "cluster") di durata compresa tra 7 giorni e un anno, separati da periodi di remissione di almeno 1 mese; la forma **cronica** viene diagnosticata in caso di attacchi di CG presenti da più di 1 anno, senza remissioni o con remissioni che durano meno di 1 mese. La cefalea a grappolo cronica può esordire de novo oppure evolvere da una forma episodica. Alcuni pazienti possono passare da una forma cronica a una episodica (IHS, 2013).

La diagnosi del disturbo è prevalentemente clinica e generalmente non sono richiesti specifici esami di laboratorio, sebbene recenti lavori sottolineino l'importanza della neuroimaging per una corretta diagnosi differenziale rispetto alle forme secondarie o sintomatiche (Wilbrink, 2009; Sandrini, 2011).

Tabella 1. Criteri diagnostici della CG.

Codice IHS	Diagnosi
3.1	Cefalea a grappolo
Criteri diagnostici:	
3.1 Cefalea a grappolo	
Criteri diagnostici:	
A. Almeno 5 attacchi che soddisfino i criteri B-D	
B. Dolore di intensità severa o molto severa, unilaterale, in sede orbitaria, sovraorbitaria e/o temporale, della durata di 15-180 minuti (senza trattamento) ¹	
C. La cefalea è associata ad una o entrambi le seguenti condizioni:	
1. almeno uno dei seguenti sintomi o segni omolaterali al dolore	
a) iniezione congiuntivale e/o lacrimazione	
b) congestione nasale e/o rinorrea	
c) edema palpebrale	
d) sudorazione facciale e frontale	
e) arrossamento facciale e frontale	
f) sensazione di orecchio pieno	
g) miosi e/o ptosi	
2. sensazione di irrequietezza o agitazione.	
D. La frequenza degli attacchi è compresa tra 1 ogni due giorni e 8 al giorno per più della metà del periodo di tempo in cui la patologia è in fase attiva	
E. Non meglio inquadrata da altra diagnosi ICHD-3.	
Note:	
1. Durante parte del decorso temporale della 3.1 Cefalea a grappolo (comunque per meno della metà della sua durata) gli attacchi possono essere di minore intensità e/o di durata inferiore o superiore a quella indicata.	

(Tabella tratta da IHS, 2013)

b) Terapia di profilassi con litio

Nella terapia della CG si distingue la *terapia dell'attacco acuto* finalizzata alla risoluzione del singolo attacco, e la *terapia preventiva* finalizzata alla riduzione della frequenza degli attacchi durante il periodo attivo. Il caratteristico pattern clinico del disturbo giustifica l'utilizzo di farmaci capaci di apportare un sollievo immediato e non permette di trascurare l'importanza di un efficace trattamento preventivo.

L'obiettivo delle terapie di profilassi nella CG è la prevenzione degli attacchi e il mantenimento del benessere per il maggior tempo possibile nei pazienti affetti dalla forma cronica, o fino alla fine del periodo attivo nei pazienti affetti da quella episodica.

Prima di impostare una terapia preventiva, è importante valutare lo stile di vita dei pazienti per identificare e modificare qualsiasi potenziale fattore scatenante gli attacchi. Per esempio, l'assunzione di alcool e il riposo pomeridiano durante il periodo

del grappolo in genere scatenano gli attacchi e dovrebbero essere evitati. L'abolizione del fumo non sembrerebbe avere invece effetti positivi sull'andamento della malattia, tuttavia a questo proposito i dati sono discordanti. Infine, a differenza di quanto rilevabile per l'emicrania, l'assunzione di alimenti che possono contenere sostanze vasoattive e produrre vasodilatazione sembra non indurre un effetto trigger per la CG (Dodick, 2000).

L'indicazione alla profilassi è considerata appropriata quando si verificano una o più delle seguenti condizioni: le crisi sono numerose, sono di intensità elevata; il grappolo si protrae a lungo, il trattamento dell'attacco acuto è insoddisfacente.

Una volta decisa la profilassi, il farmaco deve essere scelto in base al singolo paziente, valutando l'età, le eventuali comorbilità, la durata abituale del grappolo, l'anamnesi farmacologica (efficacia ed effetti indesiderati sperimentati nei precedenti trattamenti). Vi sono inoltre alcune regole generali da osservare: il trattamento preventivo deve iniziare il più precocemente possibile, raccomandando al paziente di contattare immediatamente il curante all'inizio di ogni grappolo successivo; il trattamento deve essere continuato per almeno due settimane dopo la risoluzione della fase algica e deve essere sospeso con gradualità per evitare recidive. L'uso prolungato delle terapie preventive non è raccomandato nella CG episodica, poiché non vi sono evidenze che questo prevenga il successivo periodo attivo (Leroux, 2008).

Le linee guida sul trattamento della CG della *European Federation of Neurological Societies* (EFNS) riportano il verapamil come farmaco di prima scelta, con una raccomandazione di "livello A" e il litio come farmaco di seconda scelta, con raccomandazione di "livello B", da utilizzare in caso di inefficacia o in caso di presenza di controindicazioni all'uso del verapamil (May, 2006). Una più recente review riporta entrambi i trattamenti come terapie di prima linea, sottolineando che il litio è efficace nel trattamento della CG, con più forti evidenze di efficacia nelle forme croniche rispetto alle forme episodiche (Leone, 2009).

Le altre terapie preventive raccomandate dall'EFNS sono metisergide, topiramato ed ergotamina (livello B), e acido valproico, melatonina e baclofen (livello C) (tabella 2).

Tabella 2. Raccomandazioni EFNS per il trattamento della CG.

Terapia	Trattamento di scelta
Acuta	100% Ossigeno, 15 l/min (A) Sumatriptan 6 mg s.c. (A) Sumatriptan 20 mg nasale (A) Zolmitriptan 5 mg nasale (A/B) Zolmitriptan 10 mg nasale (A/B) Zolmitriptan 10 mg orale (B) Zolmitriptan 5 mg orale (B) Lidocaina intranasale (B) Octreotide (B)
Preventiva	Verapamil (A) Steroidi (A) Litio Carbonato (B) Metisergide (B) Topiramato (B) Ergotamina Tartrato (B) Acido Valproico (C) Melatonina (C) Baclofene (C)

(A evidenze di efficacia, B evidenze di efficacia probabile, C evidenze di efficacia possibile).

(Tabella adattata da May, 2006)

Il litio, oltre ad avere l'indicazione per il trattamento della cefalea a grappolo, rappresenta il farmaco di prima scelta nel mantenimento del Disturbo Bipolare e si è dimostrato anche efficace nella prevenzione del comportamento suicidario in pazienti affetti da disturbi dell'umore (Alda, 2015; Cipriani et al., 2013).

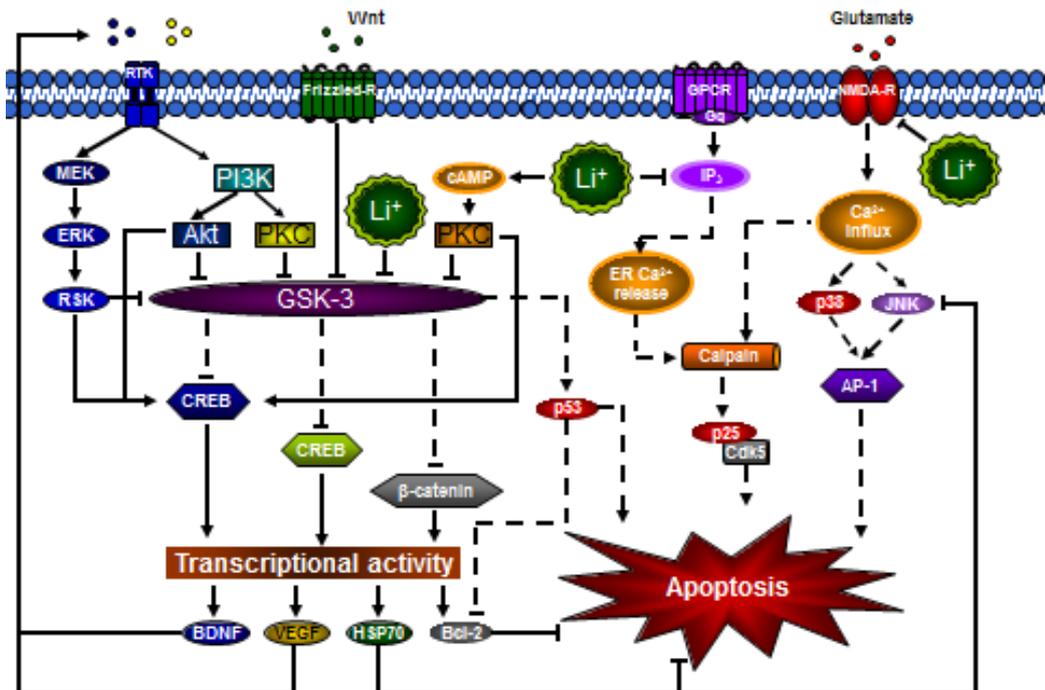
Il litio è stato studiato come farmaco di profilassi per la CG in più di 20 trial in aperto, che tuttavia risultano estremamente eterogenei in termini di criteri di inclusione, criteri di risposta, formulazione e dosaggi e schedule di trattamento (Ekbom, 1995). Nell'unico studio randomizzato e controllato con placebo disponibile in letteratura, il riscontro di un'elevata percentuale di risposta al placebo non ha permesso di dimostrare la superiorità del litio (Steiner, 1997). Nello studio comparativo in doppio cieco, il litio e il verapamil hanno mostrato efficacia sovrapponibile, con maggiore rapidità di efficacia e migliore tollerabilità del verapamil (Bussone, 1990). Il 78% dei pazienti dei pazienti affetti da CG cronica e il 63% di quelli affetti dalla forma episodica rispondono al litio, che risulta efficace a concentrazioni sieriche comprese tra 0.3 e 0.8

mmol/L, a dosaggi giornalieri generalmente compresi tra 600 e 1500 mg, in dosi frazionate. Le concentrazioni sieriche del litio efficaci nel trattamento della CG sono inferiori a quelle efficaci nel trattamento del DB, in cui sono considerati ottimali valori compresi tra 0.6 e 0.8 mmol/L come terapia di mantenimento, ma in caso di mania acuta si possono raggiungere livelli tra 0.9 e 1.1 mmol/L. I criteri di risposta alla terapia con litio in pazienti affetti da CG episodica sono stati definiti in un lavoro pubblicato dal nostro gruppo (Stochino et al., 2012).

c) Meccanismo d'azione del litio

Il meccanismo d'azione del litio non è ancora perfettamente conosciuto, ma è stato suggerito che il suo effetto possa essere mediato dall'azione su molteplici sistemi di trasduzione del segnale e regolazione della trascrizione genica (Malhi et al., 2013; Alda et al., 2015). Il litio è in grado di modulare l'attività dei sistemi di neurotrasmissione e di regolare numerose cascate di trasduzione del segnale (ad esempio tramite il suo effetto sulle proteine G, sul metabolismo dell'inositolo e sui livelli di fattori neurotrofici) (Chiu et al., 2010; Alda, 2015).

Figura 1. Azioni del litio



I meccanismi in cui è dimostrata l'azione del litio sono (figura 1):

- effetti sulle proteine G
- alterazioni di vie diverse di secondi messaggeri
- via degli inositoli
- via della Proteinkinasi C
- via dell'Adenilatociclastasi
- inibizione della Glicogeno Sintasi Kinasi-3

Nuovi possibili target del litio sono alterazioni dei segnali:

- Mediati dai recettori per i fattori neurotrofici
- Mediati dai recettori del sistema Wnt
- Modulazione dell'espressione genica
- Plasticità neuronale, neuro genesi, apoptosi
- Effetti sulla regolazione del ritmo circadiano

Uno dei target maggiormente studiati in relazione agli effetti molecolari del litio è l'enzima glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK-3), una serina-treonina chinasi ubiquitaria, costituzionalmente attiva, coinvolta nella modulazione di numerosi processi cellulari tra i quali apoptosi, plasticità sinaptica e regolazione dell'espressione genica . Il litio a concentrazioni terapeutiche inibisce l'enzima GSK-3, e in particolare l'isoforma GSK-3b, in due modi: sostituendosi al Mg e inducendo la fosforilazione di un residuo di serina nel dominio N terminale dell'enzima, con conseguente riduzione della sua attività (Alda, 2015). L'enzima GSK-3 è coinvolto nella regolazione dei livelli e dell'attività di numerosi *target*, quali ad esempio il fattore propapoptotico Bax (che induce rilascio mitocondriale del citocromo C e conseguente attivazione delle caspasi), e i fattori di trascrizione C-Jun e CREB, coinvolti nella regolazione dell'espressione di geni con effetto neurotrofico (Beurel et al., 2015). Tramite l'inibizione dell'enzima GSK-3, il litio interviene anche nella regolazione della via di segnalazione Wnt/beta-catenina (Malhi et al., 2013). L'enzima GSK-3 promuove infatti la degradazione con meccanismo ubiquitina-dipendente della beta-catenina, una proteina che gioca un ruolo critico nella modulazione dell'espressione di geni coinvolti nello sviluppo e nella sopravvivenza cellulare. L'inibizione dell'enzima GSK-3 da parte del litio consente la

preservazione della beta-catenina, la sua traslocazione nel nucleo e la conseguente attivazione della trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione e sopravvivenza neuronale.

d) Eziopatogenesi e basi genetiche

Nonostante la definizione clinica della CG sia chiara da tempo, l'eziologia e la fisiopatologia del disturbo sono ancora in gran parte sconosciuti e tuttora non è disponibile un modello fisiopatologico unificante. Qualsiasi modello fisiopatologico necessita di spiegare le tre principali caratteristiche della CG: la distribuzione trigeminale del dolore, la sintomatologia autonoma omolaterale al dolore e il classico pattern temporale dei grappoli (ricorrenza annuale ciclica) e degli attacchi che si presentano con ritmo circadiano tendente alla ripetizione a ore fisse durante il giorno (Goadsby, 2002; May, 2005). Sulla base delle caratteristiche cliniche del disturbo è possibile trarre tre importanti conclusioni: 1) la localizzazione orbitaria e sovraorbitaria del dolore suggerisce il coinvolgimento di vie nocicettive trigeminali omolaterali al dolore; 2) La comparsa di caratteristici sintomi neurovegetativi omolaterali alla sede del dolore suggerisce un ruolo importante all'attivazione del parasimpatico craniale (lacrimazione, rinorrea) e una disfunzione di strutture nervose simpatiche (ptosi palpebrale e miosi). Al seno cavernoso carotideo in quanto punto di convergenza di fibre trigeminali, parasimpatiche e simpatiche è stato assegnato un potenziale ruolo chiave. 3) La caratteristica ritmicità diurna e stagionale delle crisi suggerisce infine come confermato da alcune evidenze, il potenziale coinvolgimento di un pace-maker centrale, che nell'uomo potrebbe essere localizzato nella sostanza grigia ipotalamica, in un'area nota come nucleo soprachiasmatico (Dodick, 2000).

Sulla base delle attuali conoscenze, la teoria vascolare basata sull'infiammazione della parete del seno cavernoso è stata superata, in seguito all'identificazione di eventi neurovascolari e di generatori di impulsi a livello centrale che sembrerebbero giocare un ruolo più importante in relazione alla patogenesi del grappolo (Leone et al.,2017).

Diverse osservazioni cliniche suggeriscono l'ipotalamo o una struttura strettamente correlata ad esso, come trigger per lo scatenamento degli attacchi acuti di CG. Il decorso recidivante-remittente, la stagionalità, e la regolarità giornaliera, caratteristici

dei singoli episodi suggeriscono il coinvolgimento di un orologio biologico, ovvero l'ipotalamo, all'origine della patologia (Goadsby, 2002). La regolazione del sistema endocrino da parte dell'ipotalamo implica la modulazione ritmica e fasica degli ormoni ipofisari e melatonina nel mantenimento dell'omeostasi. L'evidenza di concentrazioni significativamente ridotte di testosterone nel plasma di pazienti maschi affetti da CG ha fornito la prima evidenza del ruolo dell'ipotalamo. Questa evidenza è stata ulteriormente supportata da una ridotta risposta al "thyrotropin-releasing hormone" (TRH) e da altre irregolarità circadiane che sono state riscontrate in pazienti con CG. Relativamente alla melatonina, riconosciuta come marker del sistema circadiano, nei pazienti affetti da CG sono stati evidenziati un attenuato picco notturno di melatonina e una completa perdita del ritmo circadiano della stessa. Il ritmo circadiano endogeno è molto complesso e uno dei sistemi di controllo sembrerebbe essere localizzato nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo ventrale, che è modulato da stimoli ambientali causati da condizioni di luminosità attraverso il *pathway* retino-ipotalamico (May, 2005).

Negli ultimi anni, le neuroimaging hanno contribuito in maniera importante a sostenere e rinforzare questa ipotesi. Studi di neuro imaging funzionale con PET (Tomografia ad Emissione di Positroni) hanno individuato un'attivazione altamente specifica della sostanza grigia dell'ipotalamo postero inferiore ipsilaterale al dolore durante attacchi di CG spontanei o indotti da nitroglicerina, suggerendo il suo coinvolgimento in termini di induzione dell'attacco. Studi di Risonanza Magnetica *morphometric voxel based* hanno documentato alterazioni nella stessa area, che sembrerebbe specifica per la CG e le altre TACs. Tali evidenze sostengono che a questo livello probabilmente sia localizzato il generatore responsabile del dolore che caratterizza gli attacchi del cluster. I risultati ottenuti con la terapia chirurgica di stimolazione ipotalamica (*Deep Brain Stimulation*) sostengono ulteriormente l'ipotesi, tuttavia la sicurezza di tale tecnica è stata messa fortemente in discussione (May, 2005; Leone et al., 2017).

Sebbene gli studi sui familiari e gli studi sui gemelli abbiano suggerito una base genetica nella patogenesi del disturbo, il reale contributo della componente genetica al fenotipo della cefalea a grappolo non è ancora stato chiarito (Schürks, 2010). Infatti, gli

studi che finora hanno evidenziato un potenziale ruolo di geni quali metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR), e i geni del sistema dell'ipocretina, necessitano di ulteriori conferme (Rainero et al., 2013; Leone et al., 2017).

Uno dei maggiori limiti degli studi di associazione genetica, finora disponibili, è che hanno incluso solo poche centinaia di casi piuttosto che le migliaia normalmente necessari per studi di associazione, sia per geni candidati che genome wide, a causa della bassa prevalenza della CG nella popolazione generale.

Gli studi di espressione genica genome wide, chiamati anche studi di trascrittomica, rappresentano un valido approccio alternativo agli studi su varianti di sequenza per identificare i geni e le pathway coinvolti nell'eziopatogenesi della CG. Tuttavia, poiché è difficile disporre di un numero adeguato di campioni di cervello umano post-mortem ben caratterizzati dal punto di vista clinico, sono stati condotti principalmente studi su campioni di sangue. A conferma della validità di tali studi, va sottolineato che per altri disturbi cerebrali, come l'epilessia, disturbi psichiatrici e neurodegenerativi, le differenze di espressione genica tra pazienti e controlli, riscontrate su sangue sono risultate simili a quelle osservate nel cervello *post-mortem* (Eising et al., 2017).

In letteratura sono disponibili tre studi di espressione genica sulla CG (Sjöstrand et al., 2006; Costa et al., 2015; Eising et al., 2017).

Nel primo studio sono stati confrontati i livelli di espressione genica su sangue intero in tre pazienti con CG, in tre diverse fasi di malattia (2 prelievi durante il periodo attivo: uno durante l'attacco, uno a distanza dall'attacco e uno nel periodo di remissione), e tre controlli. Sono stati identificati 90 geni espressi in modo differenziale, inclusi geni codificanti per proteine che legano il calcio, della famiglia delle proteine S100, descritte come marker diagnostici di infiammazione e come proteine proinfiammatorie in grado di attivare le cellule endoteliali, suggerendo un possibile ruolo dell'infiammazione sterile (Sjöstrand et al., 2006).

Il secondo studio, condotto dal nostro gruppo su linee cellulari linfoblastoidi immortalizzate, ha confrontato il trascrittoma di 8 pazienti affetti da CG responders al litio e 10 controlli sani (Costa et al., 2015). Solo 10 geni sono risultati sovrapponibili tra

i due studi. Nello studio di Costa et al. (2015) il gene più significativamente alterato è risultato l' RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3 (RBM3), overespresso nei pazienti rispetto ai controlli. Il gene RBM3 codifica per una proteina della famiglia delle proteine leganti l'RNA, note per il loro ruolo di modulazione della risposta cellulare alle basse temperature, ed è stato identificato come gene neuroprotettivo in un modello murino di patologia neurodegenerativa (Peretti et al., 2015) oltre che regolatore di importanti funzioni fisiologiche circadiane quali il sonno e la temperatura corporea (Tong et al., 2013; Wang et al., 2010; Liu et al., 2013). Il gene RBM3, inoltre, è stato trovato associato alla risposta al litio nel disturbo bipolare: sovraespresso nelle linee cellulari linfoblastoidi di pazienti affetti da disturbo bipolare *responder* al litio confrontati con non *responder* (Papadima et al., 2017).

Il terzo studio ha confrontato il profilo di espressione genica in 40 pazienti affetti da CG (19 affetti da CG episodica e 20 pazienti da CG cronica) verso 20 controlli sani, su sangue intero. Sono stati studiati un totale di 13.416 geni. Lo studio non ha evidenziato associazioni con i meccanismi patogenetici precedentemente studiati. A livello di set di geni funzionali, sono state osservate associazioni per i geni coinvolti in diversi meccanismi cerebrali, come la funzionalità del recettore GABA e i canali voltaggio dipendenti. L'analisi dei geni e dei moduli di geni co-espressi ha mostrato un ruolo nella CG delle cascate di segnalazione intracellulari, dei mitocondri e dell'infiammazione. Infine lo studio ha evidenziato una diversa espressione di geni inclusi in altre nuove *pathway*, non studiate in precedenza, tra cui quella del complesso della telomerasi (Eising et al., 2017).

1.2 Dinamica dei telomeri

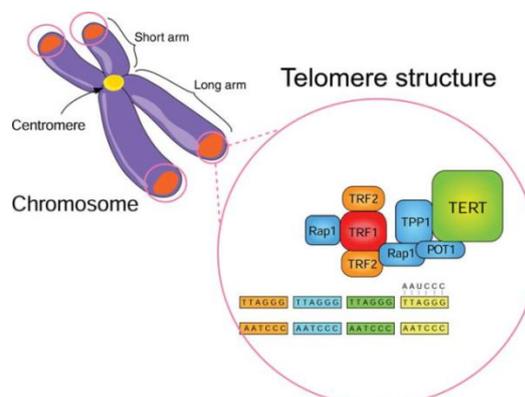
I telomeri sono strutture lineari nucleoproteiche localizzate alle estremità dei cromosomi eucariotici. Consistono di unità ripetute in tandem di sequenze di DNA esamerico (nell'uomo, e in altri animali, 5'-TTAGGG-3') (Moyzis et al., 1988). La sequenza (TTAGGG)_n dei telomeri umani è lunga circa 3-20 kb, oltre le quali si trovano circa 100-300 kb di ripetizioni associate al telomero.

Le estremità telomeriche sono essenziali per mantenere l'integrità strutturale, l'architettura tridimensionale e la stabilità del DNA. Nello specifico, i telomeri svolgono le seguenti funzioni:

1. mantengono l'integrità strutturale del genoma, proteggendo l'estremità della doppia elica da eventi di ricombinazione con altri cromosomi e dall'attività di esonucleasi, conferendo stabilità alla molecola lineare del DNA;
2. assicurano la replicazione completa della doppia elica del DNA, e dunque prevengono una perdita di materiale genomico durante la sua replicazione;
3. proteggono i cromosomi da riordinamenti strutturali (per riparazione ricombinativa con altre estremità);
4. contribuiscono a determinare l'architettura tridimensionale del nucleo e l'appaiamento dei cromosomi nel nucleo interfascio.

I telomeri si riducono progressivamente di dimensione (circa 20-200 paia di basi) ad ogni ciclo replicativo (Monaghan et al., 2010). Tale processo si protrae fino al raggiungimento di una lunghezza minima critica che segnala la fine della proliferazione, l'inizio della senescenza e la successiva morte per apoptosi della cellula (Calado et al., 2009; Hayflick et al., 1980). Questo accorciamento può essere contrastato dall'enzima telomerasi, un complesso ribonucleoproteico costituito da due componenti essenziali per l'attività dell'enzima: una subunità ad RNA (*hTERC*, *human telomerase RNA*) e una subunità catalitica (*hTERT*, *human Telomerase Reverse Transcriptase*) (Figura 2).

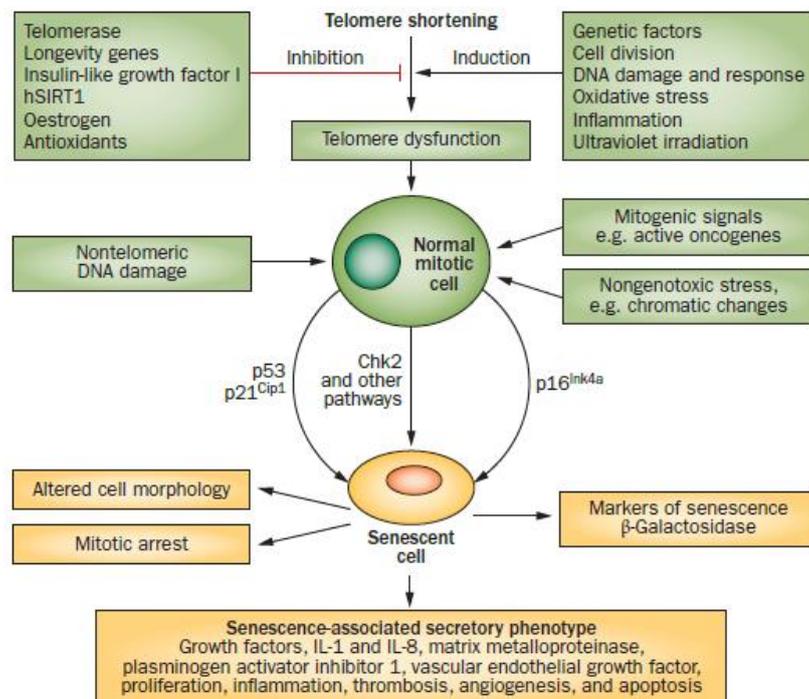
Figura 2. Struttura dei telomeri e del complesso dell'enzima telomerasi



Da Madonna et al., *Eur Heart J.* 2011

La telomerasi è una trascrittasi inversa telomero-specifica che sfrutta la subunità intrinseca a RNA come template per aggiungere ripetizioni telomeriche all'estremità dei cromosomi, contrastando il meccanismo di accorciamento terminale e impedendo il raggiungimento della lunghezza minima critica. Tuttavia, durante l'età adulta, l'enzima telomerasi risulta non espresso nella maggior parte dei tessuti, ad eccezione di quelli caratterizzati da un rapido *turnover* cellulare, quali il sistema immunitario, la cute o la mucosa intestinale. Ne consegue che nell'adulto l'attività della telomerasi è insufficiente ad evitare il progressivo accorciamento delle estremità telomeriche ad ogni divisione cellulare. L'accorciamento dei telomeri è un meccanismo fisiologico che previene la replicazione cellulare incontrollata. Tuttavia, tale accorciamento può essere accelerato da numerosi fattori quali stress ossidativo, infiammazione, mutazioni a livello dei geni che rivestono un ruolo nella biologia del telomero e deplezione delle proteine telomeriche (Aubert e Lansdopr, 2008). Il complesso insieme di fattori che possono interferire con la regolazione della lunghezza telomerica è rappresentato nella Figura 3.

Figura 3. Accorciamento dei telomeri e senescenza cellulare



Da Fyhrquist et al., *Lancet*. 2016

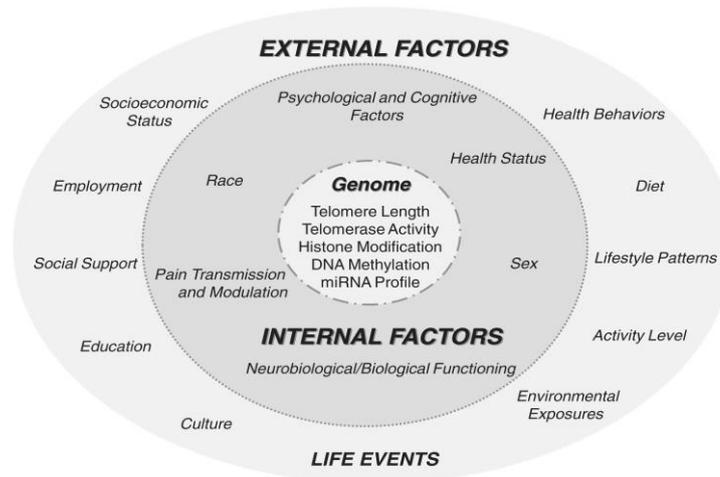
In particolare, lo stress ossidativo causa un danno irreparabile al DNA specificatamente nella regione telomerica (Rossiello et al., 2014). Un accorciamento accelerato dei telomeri è stato osservato in pazienti affetti da patologie croniche nelle quali si ritiene presente una componente infiammatoria, quali malattie cardiovascolari, diabete, tumori e malattie psichiatriche (Bojesen, 2013; Shalev et al., 2013).

La maggior parte degli studi che ha valutato la lunghezza dei telomeri nelle patologie umane ha misurato la lunghezza dei telomeri dei leucociti (LTL). Anche se la correlazione tra LTL e lunghezza dei telomeri nel cervello è stata valutata da un numero ancora limitato di studi, la LTL rappresenta un *biomarker* facilmente accessibile e correla con la lunghezza dei telomeri in altre cellule somatiche (Bodelon et al., 2014). Diversi studi hanno evidenziato una riduzione della LTL in pazienti affetti da malattie psichiatriche. La maggior parte di questi studi è stata condotta in pazienti affetti da depressione maggiore, ma sono state riportate evidenze di alterazioni nella LTL in pazienti affetti da schizofrenia, DB, disturbo post-traumatico da stress e disturbi d'ansia (Lindqvist et al., 2015; Darrow et al., 2016).

1.3 Correlazione tra lunghezza dei telomeri e dolore

Una recente revisione della letteratura ha focalizzato l'attenzione sulle evidenze a supporto del ruolo dei telomeri nei meccanismi del dolore. Gli autori hanno elaborato un modello euristico che concettualizza le interazioni tra le influenze ambientali e il funzionamento del genoma (figura 4) suggerendo la lunghezza dei telomeri quale indicatore molecolare delle conseguenze biologiche dello stress e del dolore (Sibille et al., Pain 2012).

Figura 4. Modello euristico dell'interazione tra stress / dolore e genoma umano.



Da Sibille et al., *Pain* 2012

Il modello illustra come lo stress e il dolore potrebbero influenzare processi molecolari centrali alla funzione del genoma. In particolare, gli eventi ambientali, sia interni che esterni, possono contribuire all'invecchiamento cellulare accelerato, con conseguenti alterazioni della lunghezza dei telomeri, che in ultima analisi modulano la regolazione genomica dei processi del dolore periferici e centrali.

In linea con il concetto di **sovraccarico allostatico**, la lunghezza dei telomeri, inversamente correlata alla durata dello stress, sembra funzionare come barometro della risposta cumulativa dell'organismo a stress endogeni ed esogeni a lungo termine. In quanto tale, la lunghezza dei telomeri può fungere da misura del carico del sistema, delle conseguenze del dolore cronico e dei livelli di stress ad esso associati (Sibille et al., *Pain*. 2012).

Recenti evidenze indicano che gli anziani che lamentano gonalgia cronica ed elevati livelli di stress presentano una lunghezza dei telomeri significativamente più corta rispetto a quelli che non lamentano dolore cronico e presentano bassi livelli di stress (Sibille et al., *Mol Pain* 2012) . L'accorciamento della lunghezza dei telomeri è stato inoltre dimostrato per la fibromialgia, patologia caratterizzata da dolore cronico associato a diversi fattori correlati all'accorciamento dei telomeri, quali: stress psicosociale, traumi, depressione, obesità e disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-

surrene. Lo studio ha valutato la LT in un campione di 66 donne affette da fibromialgia vs 22 controlli sani (Hassett et al., 2012).

Ulteriori studi sono necessari per determinare se la misura del telomero sia un marcatore del carico del sistema legato al dolore, sensibile nell'individuare la variabilità individuale nell'insorgenza e persistenza delle condizioni legate al dolore (Sibille et al., Pain 2012).

1.4 Correlazione tra lunghezza dei telomeri e cefalee primarie

Sulla base delle nostre conoscenze non sono disponibili studi che abbiano valutato la lunghezza dei telomeri in pazienti affetti da cefalea a grappolo. Tuttavia, è disponibile uno studio che, utilizzando la tecnica della reazione a catena della polimerasi (*real time PCR*), ha valutato la correlazione tra LTL ed emicrania, altra forma di cefalea primaria, che si manifesta con una frequenza più elevata nella popolazione generale rispetto alla cefalea a grappolo (Ren et al., 2010).

Lo studio di Ren e colleghi ha valutato la lunghezza dei telomeri leucocitari in un gruppo di 142 pazienti caucasici, di sesso femminile, affetti da emicrania vs 143 controlli caucasici e di sesso femminile, abbinati per età che non avevano mai sofferto di crisi emicraniche. L'analisi della lunghezza dei telomeri, corretta per età e BMI, ha mostrato una lunghezza dei telomeri significativamente ridotta nel gruppo dei pazienti rispetto ai controlli di una media di 0.114 unità (intervallo di confidenza del 95%, 0.136-0.091; $p < 0.001$). Inoltre l'età di esordio del disturbo è risultata associata a una ridotta lunghezza dei telomeri, soprattutto in caso di esordio precoce della malattia (<17 anni di età). Lo studio non ha evidenziato associazioni tra lunghezza dei telomeri e frequenza, durata e intensità degli attacchi emicranici.

Come atteso, è stato evidenziato un trend di associazione inversa tra lunghezza dei telomeri ed età nel gruppo dei controlli ($r = -0.11$; $p = 0.189$). Nel gruppo dei pazienti emicranici è stato, invece, osservato un trend di correlazione positiva tra lunghezza dei telomeri ed età (Ren et al., 2010).

1.5 Effetto del litio sulla lunghezza dei telomeri

Il potenziale effetto protettivo del litio nei confronti dell'accorciamento della lunghezza dei telomeri è stato suggerito per la prima volta da Martinsson e collaboratori (2013). In questo studio, i pazienti affetti da Disturbo bipolare (BD) (per la maggior parte trattati con litio) hanno mostrato una LTL maggiore rispetto ai controlli sani ($p = 0,0005$). Inoltre, lo studio ha mostrato un *trend* di associazione per una maggiore lunghezza dei telomeri nei *responder* al litio rispetto ai *non-responder* ($p = 0,047$). Infine, la durata del trattamento con litio è risultata correlare positivamente con una maggiore lunghezza dei telomeri ($p = 0,044$) in un sottocampione di pazienti in terapia con litio da almeno 30 mesi.

Lo studio effettuato dal nostro gruppo nel 2016 ha parzialmente replicato questo risultato, confermando una correlazione positiva tra LTL e anni di trattamento con litio in un campione di 150 pazienti affetti da DB e con una storia di durata di terapia con litio superiore ai 2 anni ($p = 0,037$) (Squassina et al., 2016). Inoltre, il nostro studio ha mostrato un *trend* per un aumento indotto dal trattamento *in vitro* con litio (1 mM) sui livelli di espressione del gene *TERT* (che codifica per la subunità catalitica dell'enzima telomerasi) su una linea di cellule progenitrici neurali (NPC) derivate dalla linea di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) 8330-8 (Lopez et al., 2014; Cruceanu et al., 2015).

Nel 2015, uno studio preclinico ha evidenziato che i ratti appartenenti alla *Flinders Sensitive Line*, che rappresentano un modello di depressione maggiore, mostrano telomeri più corti e ridotta espressione genica e attività dell'enzima telomerasi a livello dell'ippocampo rispetto ai ratti appartenenti alla *Flinders Resistant Line* (FRL) (Wei et al., 2015). Lo studio ha mostrato che il trattamento con litio per sei settimane era in grado di aumentare l'espressione genica e l'attività dell'enzima telomerasi ma non la lunghezza dei telomeri, supportando l'ipotesi che mentre l'effetto del farmaco sulla regolazione della trascrizione genica possa essere piuttosto rapido, la traduzione di questo effetto in un impatto sulla lunghezza telomerica possa richiedere un trattamento a lungo termine.

Considerando la scarsa letteratura disponibile e le evidenze che supportano il potenziale coinvolgimento dei telomeri nel meccanismo d'azione del litio, si rendono necessari ulteriori studi al fine di meglio comprendere il potenziale ruolo dell'interazione litio-telomeri nella CG.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Sulla base di queste premesse, e considerando i risultati dello studio di Esing e collaboratori (2017), che ha suggerito il coinvolgimento del complesso della telomerasi nella CG, gli obiettivi dello studio sono stati i seguenti:

- a) valutare se vi siano differenze nei livelli di espressione del gene codificante per la subunità catalitica della telomerasi (TERT) in linfoblasti derivati da pazienti affetti da CG rispetto ai controlli sani;
- b) valutare l'effetto del litio sui livelli di espressione del gene TERT nello stesso campione di pazienti affetti da CG e nel campione di controlli sani;
- c) valutare, in un campione più esteso, se vi siano differenze tra pazienti affetti da cefalea a grappolo e controlli sani nella lunghezza media dei telomeri dei leucociti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campione

La valutazione dei livelli di espressione del gene TERT è stata condotta sul dataset utilizzato nel nostro precedente studio di trascrittomico (Squassina et al., 2013; Costa et al., 2015). Il campione ha incluso 8 pazienti con CG episodica, reclutati presso l'Unità Complessa di Farmacologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari, e 10 controlli sani .

La lunghezza dei telomeri dei leucociti (LTL) è stata valutata su un campione esteso che includeva 51 pazienti affetti da CG (M/F = 43/8; età media al prelievo = $41,9 \pm 10,5$ anni) reclutati presso l'Unità Complessa di Farmacologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari, e 100 controlli sani (M/F = 88/12; età media al prelievo = $41,6 \pm 9,04$ anni) abbinati per sesso e per età.

La risposta al litio è stata valutata confrontando la frequenza degli attacchi di CG (numero di attacchi al giorno) nel periodo di latenza (intervallo di tempo compreso tra l'esordio del periodo attivo e l'inserimento della terapia) rispetto alla seconda settimana dall'inizio della terapia, per ciascun paziente che rispondeva ai seguenti criteri (Stochino et al., 2012):

- diagnosi di CG episodica (IHS 2004);
- presenza di un grappolo di durata superiore a un mese nel periodo precedente il grappolo valutato;
- durata media dei grappoli precedenti ≥ 20 giorni;
- periodo di latenza ≤ 10 giorni;
- trattamento preventivo con litio in monoterapia.

Sono stati considerati responder quei pazienti che hanno mostrato una riduzione della frequenza degli attacchi $\geq 50\%$ dopo il trattamento con litio rispetto al periodo di latenza.

Il Comitato Etico locale ha approvato lo studio e per tutti i soggetti partecipanti è stato ottenuto un consenso informato scritto (Costa et al., 2015; Stochino et al., 2012) e un campione di 10 ml di sangue periferico.

Le caratteristiche cliniche e demografiche del campione incluso nel nostro dataset di trascrittomico sono riportate in tabella 1a, in tabella 1b sono riportate le caratteristiche cliniche e demografiche del campione valutato per la lunghezza dei telomeri.

Tabella 1a. Caratteristiche clinico-demografiche del campione valutato per l'espressione del gene TERT

	N	Età media (anni ± DS)	Sesso (M/F)	Diagnosi
Pazienti	8	44,5 ± 11,8	5/3	CG episodica
Controlli	10	41 ± 4,4	4/6	-

CG cefalea a grappolo, N numerosità, DS deviazione standard, F femmine, M maschi, LTL lunghezza dei telomeri dei leucociti

Tabella 1b. Caratteristiche clinico-demografiche del campione valutato per la LTL

	Pazienti	Controlli
Sesso (M/F) ^a	43/8	88/12
Età ^a	43 (34; 49)	42 (35; 48)
Diagnosi (CG episodica/CG cronica)	47/4	-
Età all'esordio ^a	23 (18; 35)	-
Anni di malattia al prelievo	13 (8,24)	-
Grappoli/anno alla diagnosi ^a	1 (0,5; 1)	-
Frequenza (N attacchi/die) alla diagnosi ^a	2 (1; 3)	-
Durata media dell'attacco (ore) ^a	90 (30; 120)	-
Risposta al litio (Si/No)	17/5	-
Anni di malattia prima dell'inizio del trattamento con litio ^a	10 (5;18)	-
Durata media trattamento con litio (gg) ^a	65 (59;75)	-
Comorbidità neurologiche (Si/No)	6/16	-

F femmine; M maschi, CG cefalea a grappolo, N numerosità, gg giorni

^a = mediana (25°; 75° percentile)

3.2 Metodiche di laboratorio

a) Misurazione dei livelli di espressione del gene TERT

I livelli di espressione del gene *TERT* sono stati estratti dal dataset di dati di microarray ottenuto mediante il nostro precedente studio di trascrittomica (Squassina et al., 2013; Costa et al., 2015). Brevemente, i livelli di espressione genome-wide erano stati valutati tramite microarray GeneChip Human Gene ST 1.0 (Affymetrix, USA) su RNA estratto da cellule linfoblastoidi ottenute da pazienti affetti da cefalea a grappolo (n=8) e controlli sani (n=10). Per ogni soggetto, la coltura linfoblastoide era stata divisa in due aliquote, delle quali una è stata trattata con LiCl 1 mM per 7 giorni, mentre l'altra è stata mantenuta in coltura per 7 giorni in terreno non addizionato di LiCl.

b) Isolamento e valutazione quali-quantitativa del DNA

L'estrazione del DNA genomico è stata condotta con metodo convenzionale "salting-out" a partire da 10 ml di sangue periferico anticoagulato con EDTA (Lahiri e Nurnberger, 1991)

La valutazione quali-quantitativa del DNA estratto è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica.

In ciascun campione, opportunamente diluito, è stata valutata l'assorbanza a 260 nm per una stima quantitativa, considerando che una unità di densità ottica (D.O.) corrisponde ad una concentrazione pari a 50 µg/ml di DNA a doppia elica.

La valutazione qualitativa è stata effettuata verificando il rapporto OD260/OD280, come indice di contaminazione da proteine (considerando accettabile un valore compreso fra 1,6 e 1.8) e OD260/OD230, come indice di contaminazione da carboidrati e fenoli (considerando ottimale il valore di 2.2)

c) Valutazione della lunghezza media dei telomeri

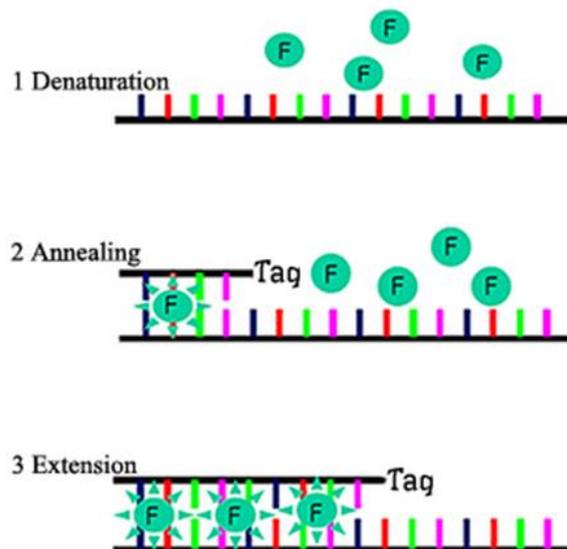
La valutazione della LTL è stata effettuata utilizzando la tecnica della **PCR Real Time Quantitativa (QPCR)**, messa a punto da Cawthon (2002), il cui protocollo è stato modificato nel nostro laboratorio. Questa tecnica, ampiamente validata, ha i vantaggi di potere essere applicata ad un alto numero di campioni, di essere relativamente poco costosa e di rapida esecuzione.

Il saggio consente di misurare quanto ciascun campione differisca da un campione di DNA di riferimento nel suo rapporto tra i numeri di ripetizioni telomeriche rispetto al numero di ripetizioni del gene hemoglobin-b (**HBB**) (codificante per la subunità beta dell'emoglobina), localizzato in singola copia nel cromosoma 11 (11p15.4).

La tecnica si basa sull'utilizzo di una molecola fluorescente, SYBR® Green I, facente parte del gruppo delle cianine asimmetriche, che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento (dsDNA) (Zipper et al., 2004). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda max di 498 nm ed emette luce verde a una lunghezza d'onda di 522 nm.

Durante la fase di denaturazione, il SYBR® Green è libero in soluzione, mentre nella fase di annealing dei primers esso si intercala in maniera aspecifica nel solco minore del dsDNA ed inizia ad emettere fluorescenza. Infine, durante la fase di extension la fluorescenza emessa aumenta in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte (Figura 1).

Figura 1. Chimica SYBR® Green



Il segnale fluorescente emesso durante la reazione viene registrato ad ogni ciclo di PCR dal sensore dello strumento e riportato in un sistema di assi cartesiani in cui è rappresentato in ascisse il numero di cicli ed in ordinate una scala logaritmica dell'emissione di fluorescenza associata ad ogni ciclo (espressa come ΔR_n). Si ottiene

così una curva ad andamento tipicamente sigmoidale con una fase esponenziale, una fase lineare e una fase di plateau in cui termina l'amplificazione e la fluorescenza si stabilizza a un valore di regime.

Al termine della reazione un software calcola per ciascun campione il **ciclo soglia (CT)** che rappresenta il numero di cicli di PCR richiesti perché il segnale di fluorescenza superi la linea di riferimento (**threshold line**), automaticamente settata dallo strumento in un punto intermedio delle curve di amplificazione dei campioni.

Il valore del CT è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione: minore è il numero di cicli necessari a superare il threshold, maggiore sarà la quantità di DNA di partenza.

Il *SYBR® Green*, legandosi in maniera aspecifica al solco minore del DNA, può generare segnali aspecifici. Pertanto, è necessario verificare la specificità della reazione mediante l'analisi della **curva di melting** (curva di dissociazione), specifica per ciascun amplicone prodotto.

Per **Temperatura di melting (Tm)** si intende la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento. Essa dipende da diversi fattori, tra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento.

L'analisi della curva di dissociazione viene eseguita dallo strumento al termine della PCR e consiste in un graduale innalzamento della temperatura da 60°C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 95°C, temperatura alla quale tutto il DNA è presente in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Il software dello strumento trasforma i dati relativi alla curva di melting nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale. Ne risulta quindi un grafico che presenta un picco nel punto di massima pendenza della curva, corrispondente alla Tm di quello specifico amplicone. La rilevazione di un unico picco nella stessa reazione di PCR dimostra l'unicità e la specificità del prodotto di PCR; al contrario la presenza di più flessi di fluorescenza, indica la formazione di prodotti amplificati aspecifici.

d) Allestimento delle reazioni

Le reazioni di PCR sono state eseguite su uno strumento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)*.

Per ciascun campione di DNA genomico è stata effettuata una reazione di qPCR relativa alle estremità telomeriche ed in parallelo una analoga reazione per l'amplificazione del gene HBB.

Pertanto sono state preparate due diverse miscele di reazione in un volume finale di 10 µl, una contenente i *primers* (Tel 1 e Tel 2, concentrazione finale 200 nM), capaci di ibridare lungo le ripetizioni esameriche presenti alle estremità telomeriche, e l'altra contenente primers specifici per il gene HBB (HBB1 e HBB2), alla concentrazione di 300 nM (Tabella 2).

Entrambe le miscele contengono Mastermix Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG con ROX (Invitrogen, by Thermofisher Scientific).

Le due miscele sono state dispensate nei pozzetti di due diverse piastre ottiche da 96 pozzetti, a cui sono stati aggiunti 20 ng di ciascun campione di DNA.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato per valutare la riproducibilità dei dati ottenuti e in ogni saggio è stato inserito un controllo negativo, in cui il DNA è stato sostituito da acqua sterile. Inoltre, in ogni piastra di PCR sono stati riservati 3 pozzetti per un campione di DNA di riferimento (calibratore) alla stessa concentrazione dei campioni, necessario a normalizzare eventuali differenze tra i diversi saggi.

Infine, allo scopo di monitorare l'efficienza delle reazioni, in ogni piastra è stata allestita una curva di diluizione standard con un DNA di riferimento, relativa alle sequenze telomeriche e al gene HBB, con range da 6.25 a 100 ng.

Tabella 2. Sequenza dei primers

Primer	Sequenza 5' → 3'
Tel-1	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT
Tel-2	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA
HBB1	GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC
HBB2	CACCAACTTCATCCACGTTCCACC

e) Profili termici e cicli di amplificazione

Le condizioni di amplificazione per le estremità telomeriche e per il gene HBB prevedono uno step di denaturazione a 95°C per 3 min, per favorire l'attivazione della Taq polimerasi. Seguono 23 cicli (15 secondi a 95°C, 1 min. a 58°C) per le estremità telomeriche e 32 cicli (15 secondi a 95°C, 1 min. a 62°C) per il gene HBB.

Tutte le reazioni di PCR sono state seguite da una curva di melting per confermare la specificità della reazione.

3.3 Analisi statistiche

a) Livelli di espressione gene TERT

I dati grezzi ottenuti tramite microarray sono stati normalizzati utilizzando l'approccio robust multi-array average (RMA, Irizarry et al., 2003). L'espressione differenziale del gene *TERT* tra CG e CO al basale e l'effetto del trattamento in vitro con litio sui livelli di espressione del gene sono stati valutati utilizzando il modello lineare implementato nel pacchetto limma (Smyth, 2005) in R v. 3.3.2 (R Core Team, 2016). I livelli di espressione sono stati esportati in GraphPad Prism v.5 per la creazione dei grafici.

b) Valutazione lunghezza dei telomeri dei leucociti

La normalità della distribuzione della lunghezza dei telomeri dei leucociti (LTL) è stata testata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. La presenza di outlier è stata valutata utilizzando il test di Grubbs (o extreme studentized deviate test). Le caratteristiche demografiche quantitative e dicotomiche sono state confrontate fra pazienti e controlli utilizzando il test U di Mann Whitney e il test Chi-quadrato di Pearson, rispettivamente.

L'associazione tra LTL e variabili quantitative e dicotomiche è stata valutata utilizzando il test di correlazione di Spearman e il test U di Mann-Whitney, rispettivamente.

In un sottocampione di pazienti per i quali queste caratteristiche cliniche erano disponibili, è stata valutata l'associazione tra LTL e le seguenti caratteristiche:

età all'esordio, diagnosi di CG episodica o cronica, anni di malattia al prelievo, grappoli/anno alla diagnosi, frequenza (n. attacchi/die) alla diagnosi, durata media

dell'attacco (ore), risposta al litio, anni di malattia prima dell'inizio del trattamento con litio, durata media trattamento con litio (giorni), comorbidità neurologiche.

Per valutare l'associazione tra LTL e le variabili cliniche, correggendo per variabili demografiche significativamente associate alla LTL, è stato inoltre costruito un modello di regressione lineare utilizzando la LTL come variabile dipendente, le altre variabili cliniche come predittori e l'età come covariata.

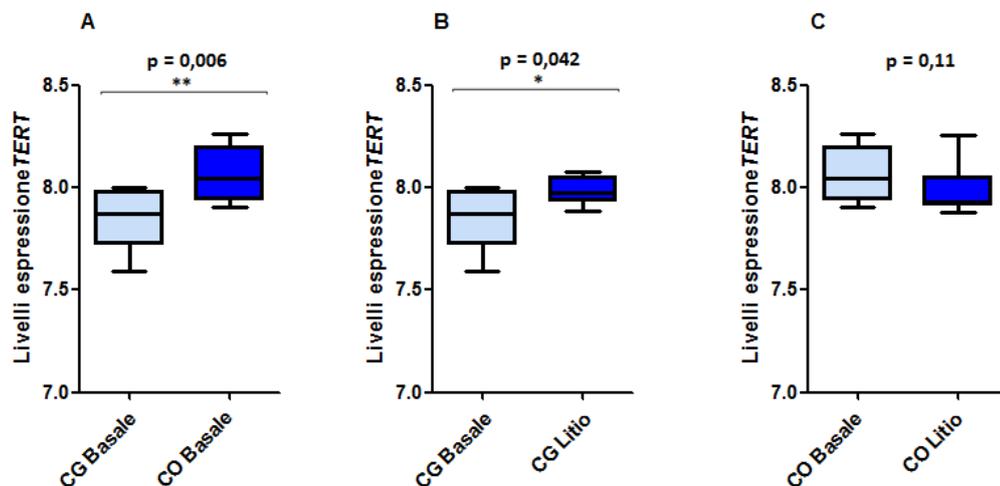
Inoltre, nel sottocampione di soggetti per i quali entrambi i dati erano disponibili (10 CT e 8 pazienti con CG) sono stati valutati: 1) la correlazione tra i livelli di espressione del gene *TERT* e la LTL utilizzando il test di correlazione di Spearman; 2) il ruolo della diagnosi di CG come mediatore della relazione tra LTL e livelli di espressione del gene *TERT* tramite la costruzione di un modello di regressione lineare utilizzando la LTL come variabile dipendente, i livelli di espressione del gene *TERT* e la diagnosi come mediatori, l'età come covariata.

4. RISULTATI

4.1 Espressione differenziale del gene *TERT* nei linfoblasti di pazienti affetti da CG

Le analisi effettuate al baseline hanno mostrato una ridotta espressione del gene *TERT* nei pazienti con CG rispetto ai controlli sani [Fold change (FC) = 0,82, $p = 0,006$, Figura 2A]. Inoltre, è stato evidenziato un trend per un effetto del trattamento in vitro con litio sui livelli di espressione del gene. Nello specifico, il litio è risultato aumentare i livelli di espressione del gene *TERT* nei pazienti affetti da cefalea a grappolo (FC = 1,12, $p = 0,042$, Figura 2B) ma non nei controlli sani (FC = 0,93, $p = 0,11$, Figura 2C).

Figura 2. Differenze nei livelli di espressione del gene *TERT* nei pazienti con CG rispetto ai controlli sani (A); Effetto del trattamento con litio sui livelli di espressione del gene *TERT* nei pazienti con CG (B) e nei controlli sani (C).



CG, Cefalea a grappolo; CO controlli sani

4.2 Valutazione lunghezza dei telomeri dei leucociti

Considerando che i nostri dati suggeriscono una differenza nei livelli del gene *TERT* tra pazienti con CG e controlli sani, abbiamo voluto esplorare ulteriormente il coinvolgimento dei telomeri nella malattia tramite valutazione della LTL nei soggetti inclusi nello studio.

La Figura 3 rappresenta le curve di amplificazione della PCR-Real time osservate per i telomeri (5.A) e per il gene HBB (5.B), dalle quali sono stati estrapolati i valori dei Ct. I valori medi di CT relativi all'amplificazione delle estremità telomeriche sono risultati 14.45 ± 0.58 , mentre per il gene HBB 22.16 ± 0.46 .

Nella Figura 4 sono rappresentate le curve di melting specifiche per le sequenze analizzate. Come possiamo osservare, le curve relative alle sequenze telomeriche (6.A) e al gene HBB (6.B) presentano un unico picco, rispettivamente a 81°C e a 84°C , a dimostrazione della specificità delle reazioni. Inoltre, i controlli negativi, corrispondenti all'assenza di DNA, non presentano alcun segnale.

Figura 3. Curve di amplificazione osservate per i telomeri (A) e per il gene HBB (B)

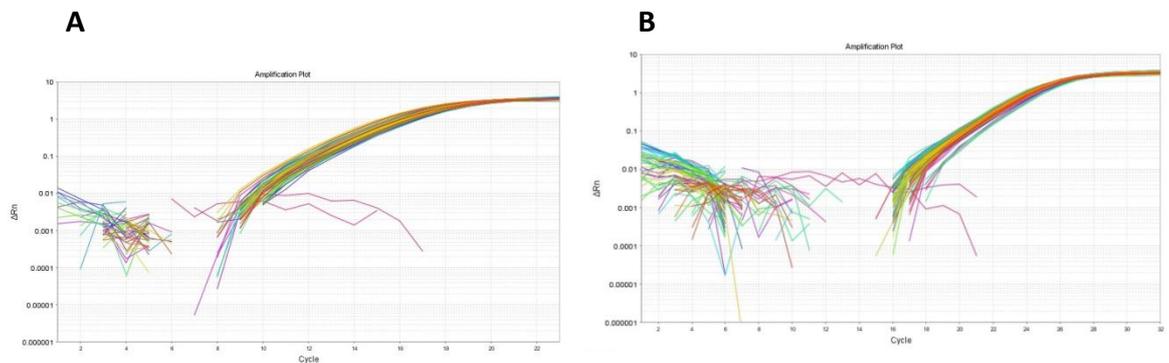
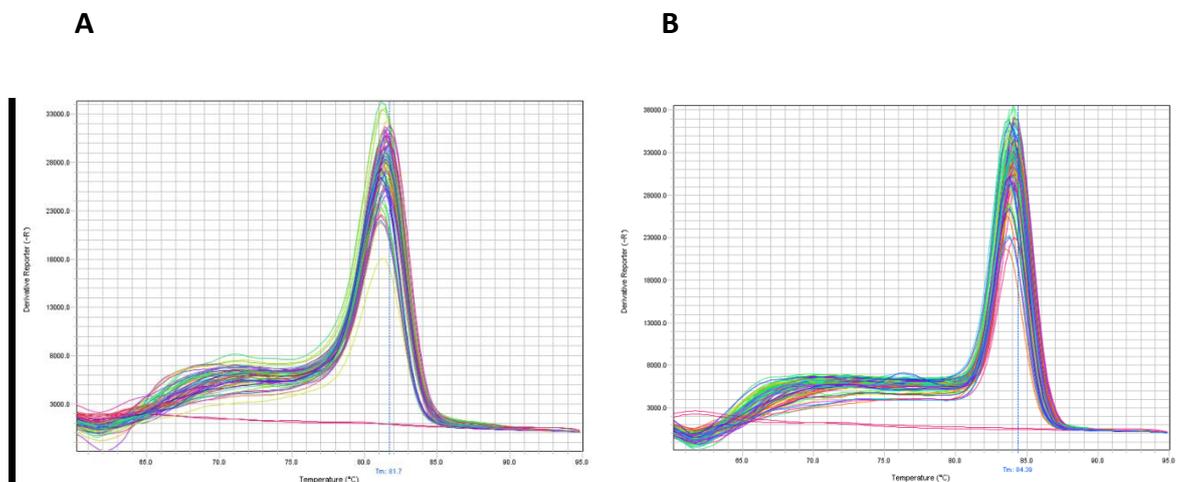


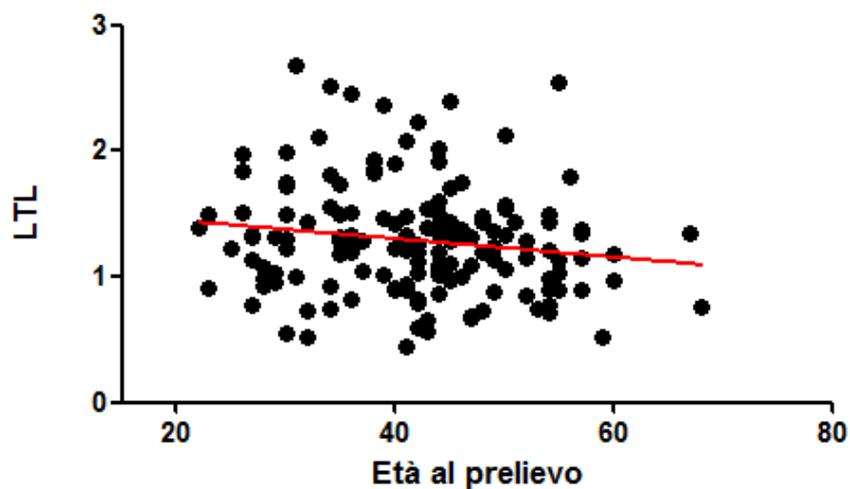
Figura 4. Curve di melting osservate per i telomeri (A) e per il gene HBB (B)



La distribuzione della LTL è risultata essere non normale secondo il test di Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,001$). Il test di Grubbs non ha evidenziato la presenza di outlier.

L'analisi di correlazione ha mostrato una correlazione negativa tra LTL ed età al momento del prelievo (rho di Spearman = -0,16, p = 0,05, Figura 5) e nessuna associazione con il sesso (Mann Whitney U = 1254, p = 0,76).

Figura 5. Correlazione tra lunghezza dei telomeri dei leucociti ed età al momento del prelievo



Il test di Mann-Whitney non ha evidenziato una differenza significativa nella LTL tra pazienti affetti da CG e controlli sani (LTL media casi/controlli: 1,26/1,30; Mann Whitney U = 2547, p = 0,99).

Nel sottocampione di pazienti con CG per i quali le caratteristiche cliniche erano disponibili, non è stata evidenziata una differenza significativa nella LTL media tra responder e non-responder al litio (LTL media responder/non-responder: 1,26/1,17, Mann Whitney U = 34, p = 0,54) o un'associazione della LTL con altre variabili cliniche (Tabella 3).

Nel sottocampione di soggetti per i quali entrambi i dati erano disponibili (10 CT e 8 pazienti con CG), il test di correlazione di Spearman non ha evidenziato una correlazione significativa tra LTL e livelli di espressione del gene *TERT* (rho di Spearman = -0,19, p = 0,45). Inoltre, la diagnosi di CG non è risultata influenzare significativamente la relazione tra LTL e livelli di espressione del gene *TERT* in un

modello di regressione lineare corretto per età (Diagnosi: Beta = 0,46, p = 0,16; TERT: Beta = 0,29, p = 0,37; Età: Beta = 0,13, p = 0,61).

Tabella 3. Associazione tra LTL e caratteristiche cliniche dei pazienti con CG

Variabili cliniche	Statistica ^a	P	Beta corretto per età	P corretto per età
Età all'esordio ^a	-0,20	0,21	-0,19	0,35
Diagnosi (CG episodica / CG cronica) ^b	54,00	0,17	-0,19	0,18
Anni di malattia al prelievo ^a	0,08	0,61	0,18	0,35
Grappoli/anno alla diagnosi ^a	-0,05	0,84	-0,15	0,53
Frequenza (N. attacchi/die) alla diagnosi ^a	0,22	0,33	0,21	0,35
Durata media dell'attacco (ore) ^a	0,15	0,52	-0,07	0,76
Risposta al litio ^b	34,00	0,54	0,06	0,80
Anni di malattia prima dell'inizio del trattamento con litio ^a	0,003	0,99	0,18	0,47
Durata media trattamento con litio(gg) ^a	0,31	0,16	0,23	0,32
Comorbidità neurologiche ^b	30,00	0,20	0,26	0,25

^a Variabili quantitative per le quali la colonna statistica riporta il coefficiente rho di Pearson

^b Variabili dicotomiche per le quali la colonna statistica riporta la U di Mann-Whitney

5. DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo evidenziato una ridotta espressione del gene *TERT*, che codifica per la subunità catalitica dell'enzima telomerasi, in 8 pazienti affetti da CG episodica rispetto a 10 controlli sani, utilizzando dati di trascrittomica di un nostro studio precedente (Squassina et al.,2013; Costa et al., 2015). Tale risultato è in linea con l'evidenza di un'espressione differenziale dei geni della *pathway* della telomerasi in pazienti affetti da CG rispetto ai controlli, emersa da un recente studio di *gene expression* (Eising et al.,2017).

Abbiamo inoltre riscontrato un trend per un aumento indotto dal trattamento in vitro con litio (1 mM) sui livelli di espressione del gene *TERT* nei pazienti affetti da CG, ma non nei controlli. Anche questo dato concorda con la letteratura. Infatti l'ipotesi che il complesso meccanismo d'azione del litio possa includere un effetto di modulazione della telomerasi è stata testata inizialmente in un modello murino di depressione: *Flinders sensitive line*. Lo studio ha mostrato che i ratti appartenenti a questa linea rispetto a quelli appartenenti alla *Flinders Resistant Line* mostrano telomeri più corti e ridotta attività della telomerasi a livello dell'ippocampo. Inoltre, il trattamento con litio per sei settimane era in grado di aumentare l'espressione genica e l'attività della telomerasi (Wei et al., 2015). Nel 2016, il nostro gruppo ha evidenziato che il trattamento in vitro con litio aumenta i livelli di espressione del gene *TERT* in una linea di cellule progenitrici neurali derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (Squassina et al., 2016).

In questo studio abbiamo inoltre valutato la lunghezza media dei telomeri dei leucociti in un campione più esteso, di 51 pazienti affetti da CG rispetto a 100 controlli sani, ma non abbiamo riscontrato differenze significative nella LTL tra i due gruppi. Nel sottogruppo di pazienti caratterizzati per la risposta al litio non abbiamo evidenziato differenze tra *responder* e *non responder* al litio, né un'associazione della LTL con altre variabili cliniche. Sulla base delle nostre conoscenze, si tratta del primo studio che ha valutato la possibile correlazione tra LTL e CG. L'ipotesi di tale correlazione si basa (I) sulle evidenze di una correlazione tra accorciamento dei telomeri e dolore (Sibille et al., Pain 2012) ,(II) tra accorciamento dei telomeri ed emicrania (Ren et al., 2010), altra

forma di cefalea primaria più frequente nella popolazione generale rispetto alla CG e (III) sulle evidenze a sostegno dell'effetto protettivo del litio sull'accorciamento dei telomeri nel Disturbo Bipolare (Martinsson et al., 2013; Wei et al., 2015; Squassina et al., 2016) che rappresenta la principale indicazione clinica del farmaco.

I risultati di questo studio devono essere interpretati tenendo conto dei suoi limiti: (I) La limitata numerosità campionaria dello studio di trascrittomico e il limitato numero di pazienti affetti dalla forma cronica rispetto a quella episodica nel campione valutato per la LTL; (II) la LTL è stata associata con numerose variabili in altri studi, quali fumo di sigaretta, obesità e numerose patologie somatiche che nel presente studio non è stato possibile considerare come potenziali fattori di correzione; (III) come effettuato nella maggior parte degli studi precedenti, la lunghezza telomerica è stata misurata in un tessuto periferico e non a livello cerebrale; (IV) i livelli di espressione del gene TERT sono stati misurati su linee cellulari linfoblastoidi. Le linee cellulari linfoblastoidi, ottenute tramite immortalizzazione dei linfociti B con il virus di Epstein Barr, rappresentano un utile modello per lo studio del meccanismo d'azione dei farmaci e per l'identificazione di biomarker. Tuttavia, il processo di immortalizzazione può interferire con la funzionalità del complesso deputato alla regolazione della lunghezza telomerica.

6. CONCLUSIONI

La ridotta espressione del gene TERT nei pazienti affetti da CG rispetto ai controlli sani suggerisce (supporta l'evidenza di) un potenziale coinvolgimento del complesso della telomerasi nella patogenesi della CG, come anticipato in (o suggerita da) un recente studio di *gene expression* (Eising et al., 2017). L'effetto differenziale del litio sulla modulazione dell'espressione di tale gene, come già evidenziato in studi precedenti su linee cellulari umane (Squassina et al., 2016) e su ratti (Wei et al., 2015), supporta ulteriormente tale ipotesi. Tuttavia, i nostri risultati relativi allo studio della LTL suggeriscono l'assenza di differenze significative nella LTL tra pazienti affetti da CG e controlli.

Come discusso in precedenza, le ragioni di questa incongruenza potrebbero essere legate ai limiti dello studio e supportano, pertanto, la necessità di ulteriori studi su campioni indipendenti e di maggiori dimensioni e che, possibilmente, utilizzino un disegno prospettico-longitudinale al fine di meglio comprendere il ruolo di alterazioni nella dinamica dei telomeri nella patogenesi della CG e nel meccanismo d'azione del litio.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alda M. Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics. *Mol Psychiatry*. 2015; 20:661-670
- Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008; 88:557-579
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015; 148:114-31
- Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000; 408:53-56
- Bodelon C, Savage SA, Gadalla SM. Chapter five-telomeres in molecular epidemiology studies. In: Calado RT (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press, 2014: 113–131
- Bojesen SE. Telomeres and human health. *J Intern Med*. 2013; 274:399-413
- Bussone G, Leone M, Peccarisi C et al. Double blind comparison of lithium and verapamil in cluster headache prophylaxis. *Headache* 1990; 30: 411-417
- Cawthon, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30 (10): p.e47
- Chiu CT, Chuang DM. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol Ther*. 2010;128(2):281-304.
- Cipriani A, Hawton K, Stockton S, Geddes JR. Lithium in the prevention of suicide in mood disorders: updated systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013; 346:f3646
- Costa M, Squassina A, Piras IS, Pisanu C, Congiu D, Niola P, Angius A, Chillotti C, Ardaù R, Severino G, Stochino E, Deidda A, Persico AM, Alda M, Del Zompo M. Preliminary Transcriptome Analysis in Lymphoblasts from Cluster Headache and Bipolar Disorder Patients Implicates Dysregulation of Circadian and Serotonergic Genes. *J Mol Neurosci*. 2015;56(3):688-95
- Cruceanu C, Tan PP, Rogic S, Lopez JP, Torres-Platas SG, Gigek CO, Alda M, Rouleau GA, Pavlidis P, Turecki G. Transcriptome sequencing of the anterior cingulate in bipolar disorder: dysregulation of G protein-coupled receptors. *Am J Psychiatry*. 2015; 172:1131-1140
- Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, Lindqvist D, Penninx BW, Delucchi KL, Wolkowitz OM, Mathews CA. The Association Between Psychiatric Disorders and

- Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom Med.* 2016; 78:776-787
- Dodick DW, Rozen TD, Goadsby PJ & Silberstein SD. Cluster headache. *Cephalalgia* 2000; 20:787-803
 - Eising E, Pelzer N, Vijfhuizen LS, Vries B, Ferrari MD, 't Hoen PA, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM. Identifying a gene expression signature of cluster headache in blood. *Sci Rep.* 2017 11;7:40218
 - Ekbohm K, Svensson DA, Träff H, Waldenlind E. Age at onset and sex ratio in cluster headache: observations over three decades. *Cephalalgia* 2002;22(2):94-100
 - Ekbohm K. Treatment of cluster headache: clinical trials, design and results. *Cephalalgia* 1995; 15: 33-36
 - Fischera M, Marziniak M, Gralow I, Evers S. The incidence and prevalence of cluster headache: a meta-analysis of population-based studies. *Cephalalgia* 2008;28(6):614-8
 - Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2013; 10:274-283
 - Goadsby PJ. Pathophysiology of cluster headache: a trigeminal autonomic cephalgia. *Lancet Neurol.* 2002;1:251–257
 - Hassett AL, Epel E, Clauw DJ, Harris RE, Harte SE, Kairys A, Buyske S, Williams DA. Pain is associated with short leukocyte telomere length in women with fibromyalgia. *J Pain.* 2012;13(10):959-69.
 - Hayflick L. Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev.* 1980; 14:59-79
 - Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33:629
 - Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society (HIS). The International Classification of Headache Disorders, 2nd edn. *Cephalalgia* 2004;24(Suppl 1):1-160
 - Kunkle EC, Pfeiffer JB Jr, Wilhoit WM, Hamrick LW Jr. Recurrent brief headache in cluster pattern. *Trans Am Neurol Assoc.* 1952;56:240-3

- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* Oct 11;19(19):5444
- Leone M, Franzini A, Cecchini AP, Mea E, Broggi G, Bussone G. Cluster headache: pharmacological treatment and neurostimulation. *Nat Clin Pract Neurol.* 2009;5(3):153-62
- Leone M, Proietti Cecchini A. Advances in the understanding of cluster headache. *Expert Rev Neurother.* 2017;17(2):165-172
- Leroux E, Ducros A. Cluster headache. *Orphanet J Rare Dis.* 2008; 23;3:20
- Lindqvist D, Epel ES, Mellon SH, Penninx BW, Révész D, Verhoeven JE, Reus VI, Lin J, Mahan L, Hough CM, Rosser R, Bersani FS, Blackburn EH, Wolkowitz OM. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 55:333-364
- Liu Y, Hu W, Murakawa Y et al. Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation. *Sci Rep* 2013; 3:2054
- Lopez JP, Lim R, Cruceanu C, Crapper L, Fasano C, Labonte B, Maussion G, Yang JP, Yerko V, Vigneault E, El Mestikawy S, Mechawar N, Pavlidis P, Turecki G. miR-1202 is a primate-specific and brain-enriched microRNA involved in major depression and antidepressant treatment. *Nat Med.* 2014; 20:764-768
- Louter MA, Wilbrink LA, Haan J, van Zwet EW, van Oosterhout WP, Zitman FG, Ferrari MD, Terwindt GM. Cluster headache and depression. *Neurology.* 2016;87(18):1899-1906
- Madonna R, De Caterina R, Willerson JT, Geng YJ. Biologic function and clinical potential of telomerase and associated proteins in cardiovascular tissue repair and regeneration. *Eur Heart J.* 2011; 32:1190-1196
- Malhi GS, Tanious M, Das P, Coulston CM, Berk M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. Current understanding. *CNS Drugs.* 2013; 27:135-53
- Martinsson L, Wei Y, Xu D, Melas PA, Mathé AA, Schalling M, Lavebratt C, Backlund L. Long-term lithium treatment in bipolar disorder is associated with longer leukocyte telomeres. *Transl Psychiatry.* 2013; 3:e261

- May A. Cluster headache: pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet*. 2005;366:843–855
- May A, Leone M, Afra J, Linde M, Sàndor PS, Evers S, Goadsby PJ. EFNS guidelines on the treatment of cluster headache and other trigeminal autonomic cephalalgias. *European Journal of Neurology* 2006; 13: 1066–1077
- Monaghan P. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1206:130-142
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85:6622-6626.
- Papadima EM, Niola P, Melis C, Pisanu C, Congiu D, Cruceanu C, Lopez JP, Turecki G, Ardaù R, Severino G, Chillotti C, Del Zompo M, Squassina A. Evidence towards RNA Binding Motif (RNP1, RRM) Protein 3 (RBM3) as a Potential Biomarker of Lithium Response in Bipolar Disorder Patients. *J Mol Neurosci*. 2017;62(3-4):304-308
- Peretti D, Bastide A, Radford H et al (2015) RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature* 12:236–239
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rainero I. et al. Genes and primary headaches: discovering new potential therapeutic targets. *J Headache Pain* 2013; 14, 61
- Ren H1, Collins V, Fernandez F, Quinlan S, Griffiths L, Choo KH. Shorter telomere length in peripheral blood cells associated with migraine in women. *Headache* 2010;50(6):965-72
- Robbins MS. The psychiatric comorbidities of cluster headache. *Curr Pain Headache Rep*. 2013;17(2):313
- Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev*. 2014; 26:89-95

- Sandrini G, Friberg L, Coppola G, Jänig W, Jensen R, Kruit M, Rossi P, Russell D, del Río MS, Sand T, Schoenen J; Neurophysiological tests and neuroimaging procedures in non-acute headache (2nd edition). *Eur J Neurol*. 2011;18(3):373-81
- Schürks M. Genetics of cluster headache. *Curr Pain Headache Rep*. 2010; 14, 132–9
- Shalev I, Entringer S, Wadhwa PD, Wolkowitz OM, Puterman E, Lin J, Epel ES. Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38:1835-1842
- Sibille KT, Langae T, Burkley B, Gong Y, Glover TL, King C, Riley JL 3rd, Leeuwenburgh C, Staud R, Bradley LA, Fillingim RB. Chronic pain, perceived stress, and cellular aging: an exploratory study. *Mol Pain*. 2012; 12;8:12
- Sibille KT, Witek-Janusek L, Mathews HL, Fillingim RB. Telomeres and epigenetics: potential relevance to chronic pain. *Pain*. 2012;153(9):1789-93
- Sjaastad O, Bakketeig LS. Cluster headache prevalence: vega study of headache epidemiology. *Cephalalgia* 2003; 23: 528–533
- Sjöstrand C, Duvefelt K, Steinberg A, Remahl IN, Waldenlind E, Hillert J. Gene expression profiling in cluster headache: a pilot microarray study. *Headache* 2006;46(10):1518-34
- Smyth GK (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds) *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. Springer, New York, NY, pp 397–420
- Squassina A, Costa M, Congiu D, Manchia M, Angius A, Deiana V, Ardau R, Chillotti C, Severino G, Calza S, Del Zompo M. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) expression is up-regulated in lymphoblastoid cell lines of lithium responsive bipolar disorder patients. *Pharmacol Res*. 2013;73:1-7
- Squassina A, Pisanu C, Congiu D, Caria P, Frau D, Niola P, Melis C, Baggiani G, Lopez JP, Cruceanu C, Turecki G, Severino G, Bocchetta A, Vanni R, Chillotti C, Del Zompo M. Leukocyte telomere length positively correlates with duration of lithium treatment in bipolar disorder patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016; 26:1241-1247
- Squassina A, Pisanu C, Corbett N, Alda M. Telomere length in bipolar disorder and lithium response. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017;27(6):560-567

- Steiner TJ, Hering R, Couturier EG, Davies PT, Whitmarsh TE. Double-blind placebo-controlled trial of lithium in episodic cluster headache. *Cephalalgia* 1997;17(6):673-5
- Stochino ME, Deidda A, Asuni C, Cherchi A, Manchia M, Del Zompo M. Evaluation of lithium response in episodic cluster headache: a retrospective case series. *Headache* 2012;52(7):1171-5
- Stovner LJ, Andree C. Prevalence of headache in Europe: a review for the Eurolight project. *J Headache Pain* 2010;11(4):289-99
- Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM et al. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res* 2013; 1504: 74–84
- Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JW, Wang SJ. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* 2015;156(6):1003-7
- Wang H, Liu Y, Briesemann M, Yan J. Computational analysis of gene regulation in animal sleep deprivation. *Physiol Genomics* 2010; 42: 427–436
- Wei YB, Backlund L, Wegener G, Mathé AA, Lavebratt C. Telomerase dysregulation in the hippocampus of a rat model of depression: normalization by lithium. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015; 18:pyv002
- Wei YB, Martinsson L, Liu JJ, Forsell Y, Schalling M, Backlund L, Lavebratt C. hTERT genetic variation in depression. *J Affect Disord.* 2016; 189:62-69
- Wilbrink LA, Ferrari MD, Kruit MC, Haan J. Neuroimaging in trigeminal autonomic cephalgias: when, how, and of what? *Curr Opin Neurol.* 2009;22(3):247-53
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum J. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acid Res.* 31: e103