

# Relación entre genotipos del gen *catecol O-metiltransferasa* y la gravedad de la fibromialgia

Ferran Josep García-Fructuoso<sup>a</sup>, José Ignacio Lao-Villadóniga<sup>b</sup>, Katrin Beyer<sup>c</sup> y Cristina Santos<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Reumatología. Clínica CIMA. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Departamento de Genética Molecular. Laboratorios Dr. Echevarne. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Patologia. Barcelona. España.

<sup>d</sup>CIRN/Departamento de Biología. Universidade dos Açores. S. Miguel. Açores. Portugal.

**Fundamento y objetivo:** Determinar la posible relación entre los genotipos *Val158Met* del gen *catecol O-metiltransferasa (COMT)* y la severidad del síndrome de fibromialgia (FM).

**Pacientes y métodos:** El estudio incluyó 110 pacientes de edades comprendidas entre 45 y 55 años diagnosticados de FM (ACR 1990) y 110 muestras de controles sanos sin dolor ni fatiga anormal (Banco Nacional de ADN). Como medida de gravedad de la FM se utilizó el cuestionario de impacto de fibromialgia (FIQ), y se estableció el valor  $FIQ \geq 70$  para determinar FM severa, criterio que cumplieron el 35,5% de pacientes. Los polimorfismos se analizaron mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar. Todos los grupos cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Resultados:** La frecuencia del genotipo *Met/Met* es más baja en controles (20,9%) que en casos (34,5%), mientras que la de *Val/Val* es más alta en controles (30,9%) que en casos (20,0%), y las diferencias son significativas ( $p = 0,048$ ). Los valores medios de FIQ son más altos en los genotipos *Met/Met* (71,67) y *Val/Met* (68,27) y más bajos en el genotipo *Val/Val* (58,93). El test de Tukey de comparaciones múltiples indica que los valores de FIQ presentan diferencias significativas cuando se compara *Met/Met/Val/Val* (Tukey,  $p < 0,001$ ) y *Val/Val/Val/Met* (Tukey,  $p = 0,003$ ).

**Conclusiones:** Nuestros resultados parecen indicar que el genotipo *Met/Met* está asociado a cuadros clínicos de FM más graves.

**Palabras clave:** Fibromialgia. Genética. *Catecol O-metiltransferasa (COMT)*. Índice de severidad de la enfermedad. Polimorfismo.

## Relationship between *COMT* gene genotypes and severity of fibromyalgia

**Background and aim:** To determine the possible relationship between *Val158Met* genotypes of the *COMT* gene and the severity of fibromyalgia (FM) syndrome.

**Patients and methods:** The study included 110 patients aged between 45 and 55 years old diagnosed with FM (ACR, 1990) and 110 samples from control subjects with no pain and no abnormal fatigue (National DNA Bank, Spain). To measure the severity of fibromyalgia, the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) was used. Severe FM was defined as an FIQ of  $\geq 70$  and was found in 35.5% of the patients. Polymorphisms were analyzed using standard polymerase chain reaction techniques. All the groups met the Hardy-Weinberg equilibrium.

**Results:** The frequency of the *Met/Met* genotype was lower in controls (20.9%) than in patients (34.5%), whereas that of the *Val/Val* genotype was higher in controls (30.9%) than in patients (20.0%), with significant differences ( $p = 0.048$ ). The mean FIQ values were higher in the *Met/Met* genotypes (71.67) and *Val/Met* genotypes (68.27) and were lower in the *Val/Val* genotype (58.93). Tukey's multiple comparison test indicated that FIQ values presented significant differences when *Met/Met/Val/Val* (Tukey,  $p < 0.001$ ) and *Val/Val/Val/Met* (Tukey,  $p = 0.003$ ) were compared.

**Conclusions:** Our results appear to indicate that the *Met/Met* genotype is associated with greater severity of FM symptoms.

**Key words:** Fibromyalgia. Genetics. *Catechol O-methyltransferase (COMT)*. Severity of index. Polymorphism.

Correspondencia: Dr. F.J. García.  
Servicio de Reumatología. Clínica CIMA.  
Paseo Manuel Girona, 33. 08034 Barcelona. España.  
Correo electrónico: ferran.garcia@cimaclinic.com

Manuscrito recibido el 24-1-2006 y aceptado el 21-3-2006.

## Introducción

Los estudios realizados en los últimos años han confirmado la observación clínica de que hay grandes diferencias individuales en la sensibilidad y tolerancia a la sensación dolorosa. Hoy, la evidencia apunta a que es-

tas variaciones fenotípicas son el reflejo de diferencias genéticas<sup>1</sup>.

La fibromialgia (FM) se define, según los criterios de clasificación de caso del American College of Rheumatology (ACR) de 1990, como un síndrome de dolor generalizado de más de 3 meses de evolución y que, a la palpación digital con una fuerza de 4 kg, revela unos puntos dolorosos característicos<sup>2</sup>. Se asocia frecuentemente a otros procesos, como el síndrome de intestino irritable, vejiga irritable, dolor pélvico crónico, cefalea, disfunción temporomandibular, síndrome de piernas inquietas y sensibilidad química múltiple<sup>3</sup>. En España afectaba en el año 2000 al menos a un 2,4% de la población general de forma casi exclusiva a mujeres<sup>4</sup>.

Aunque la causa es desconocida, está ampliamente aceptada la presencia de una alteración en la percepción del dolor siguiendo un modelo complejo de "sensibilización central"<sup>5</sup> en el que participarían diversas alteraciones en la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal<sup>6</sup>, y una regulación anormal del sistema nervioso simpático<sup>7</sup>. La enzima catecol-O-metiltransferasa (*COMT*) interviene de forma significativa en la inactivación de las catecolaminas, a través de la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la dopamina, noradrenalina y adrenalina y secundariamente la síntesis de neuropéptidos como las dinorfinas, beta-endorfinas y encefalinas<sup>8</sup>. El gen codificador de la enzima tiene el mismo nombre (*COMT*) y se ubica en el cromosoma 22, en concreto en la región 22q11.1-22q11.2. Este gen (GenBank n.º: Z26491) contiene un polimorfismo en el codón 158 con la sustitución de la base purínica guanina por adenosina. Esta transición de un solo nucleótido condiciona el reemplazo del aminoácido valina (Val) por metionina (Met) en la enzima que codifica el gen, dando lugar al llamado Val158Met (rs4680). Es ampliamente aceptado que la variación genética en el codón 158 del gen *COMT* es la principal causa de alteración de la función enzimática en humanos. Los genotipos y los alelos *COMT* se relacionan con los niveles de actividad enzimática de la enzima *COMT*, de tal forma que el genotipo *Val/Val* condiciona la máxima actividad (*COMT* H-H), *Val/Met* la intermedia (*COMT* H-L) y *Met/Met* la más baja (*COMT* L-L, de 3 a 4 veces menor actividad)<sup>9</sup>. La distribución de estos genotipos se ha analizado en diversas poblaciones (OMIM [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)).

Tanto los genotipos del gen *COMT* como los alelos y determinados haplotipos se han relacionado con diversas enfermedades y circunstancias clínicas, como los trastornos de ansiedad, la migraña, la adicción a la nicotina y las respuestas alteradas en la metabolización de algunos fármacos antidepressivos, entre otras, así como con la sensibilidad al dolor en personas sanas<sup>1,8</sup> y con la FM<sup>10-12</sup>, en cambio no parecen tener relación con modelos reconocidos de dolor neuropático<sup>13</sup>.

La agregación familiar de la FM se ha puesto de manifiesto a través de muchos estudios y sugiere que di-

cha agregación se debe esencialmente a factores genéticos<sup>14-16</sup>.

La estratificación de la severidad de la FM, su pronóstico y el intento de clasificación en subgrupos, han adquirido especial relevancia<sup>17</sup> ante la habitual utilización de criterios de clasificación de casos como criterios de diagnóstico clínico<sup>18</sup> y la alta prevalencia del síndrome en un contexto de masiva reivindicación juridicosocial. El cuestionario de impacto de fibromialgia (fibromyalgia impact questionnaire [FIQ]) es un cuestionario autoadministrado de muy rápida realización (3-5 min) que constituye el "patrón de oro" en la valoración de la severidad del impacto del síndrome en un enfermo concreto en un momento dado<sup>19,20</sup>; valora características como: dolor, fatiga, capacidad de trabajo (externo o doméstico), discapacidades, sensación de bienestar, rigidez, ansiedad y depresión, a través de 10 escalas que se valoran independientemente o en conjunto de forma homogénea del 0 al 100 (máxima afectación), mediante una fórmula actualizada en 2002 que lo permite incluso si el paciente no responde a todas las cuestiones<sup>19</sup>.

El presente trabajo analiza la relación entre FM y genotipos *COMT* y desarrolla la hipótesis de que determinados genotipos que condicionan baja actividad enzimática pueden tener relación con la severidad de la FM medida con el valor absoluto del FIQ.

## Pacientes y métodos

### Casos y controles

Para este trabajo de casos y controles, que cumple las normas éticas de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y todas sus enmiendas, incluyendo las de Edimburgo de 2000, se seleccionaron 110 pacientes (103 mujeres y 7 varones), de edades comprendidas entre 45 y 55 años, diagnosticados basándose en los criterios de 1990 del ACR<sup>2</sup>, que acudieron a nuestro servicio de reumatología (Clínica CIMA) de forma sucesiva y que prestaran su consentimiento informado por escrito para el estudio.

Como controles se solicitaron muestras de ADN de 110 personas sanas, sin dolor y sin fatiga (basándose en los cuestionarios del Banco Nacional de ADN), de la misma franja de edad y proporción de sexo al Banco Nacional de ADN (Universidad de Salamanca, España. <http://www.bancoadn.org>).

El Comité Ético del Banco Nacional de ADN aprobó el estudio en fecha 25/11/2005 con el número 0002 de su protocolo.

### Genotipado

El ADN se extrajo de las células de sangre periférica de los enfermos mediante un kit Quiamp (Quiagen-Ale-

mania) y se recibió ya extraído en los controles sanos procedentes del Banco Nacional de ADN.

Los genotipos *COMT Val158Met* se determinaron mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando métodos exhaustivos<sup>21</sup>. La PCR se realizó sobre un volumen total de reacción de 25 µl conteniendo 1 TAQ buffer (Boehringer Mannheim), 2 µCi ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) dCPT (New England Biolabs), 200 µM dNTPs (250 µM dATP, dGTP y dTTP y 25 µM dCPT), 1 µM de iniciadores (5'-GCC CGC CTG CTG TCA CC-3' y 5'-CTG AGG GGC CTG GTG ATA GTG-3') directo e inverso, respectivamente, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim) y 100 ng de ADN genómico. La PCR se realizó siguiendo ciclos estándar para desnaturalización, alineación y amplificación (5' a 94 °C seguido de 35 ciclos de 30' a 95 °C, 30' a 55 °C y 40' a 72 °C). Para la digestión del fragmento resultante de 238 pares de bases se utilizó NlaIII como enzima de restricción (New England Biolabs) durante un mínimo de 3 h a 37 °C de los productos amplificados. Los fragmentos de restricción se diluyeron y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% a temperatura ambiente, se visualizaron bajo luz ultravioleta y se codificaron de acuerdo con la longitud del producto de la PCR. Todas las detecciones se realizaron por duplicado para asegurar su reproducibilidad y minimizar posibles errores y se incluyó un control negativo en cada prueba.

Se solicitó a los pacientes que cumplimentasen el FIQ en su versión validada en castellano<sup>22</sup> y se cuantificó por 2 evaluadores para minimizar cualquier posible error, el resultado total de éste con la corrección de 2002, basándose en una escala 0-100, siendo 100 la máxima afectación. Todos los pacientes seleccionados cumplimentaron el cuestionario y permitieron la realización de la extracción de sangre. Todas las muestras de sangre se pudieron procesar y se extrajo suficiente ADN para el estudio. Se tabularon los genotipos *COMT* en los controles y genotipos y valor total FIQ en los casos. Se utilizó el valor recomendado de corte de  $\text{FIQ} \geq 70$  para calificar al paciente como "severamente afectado"<sup>19</sup>.

### Análisis estadístico

Las frecuencias genotípicas de los grupos considerados control, casos, casos  $\text{FIQ} < 70$  y casos  $\text{FIQ} \geq 70$  se utilizaron en los tests exactos<sup>23</sup>, que permiten evaluar la conformidad con las premisas del equilibrio de Hardy-Weinberg y también en la realización de los tests exactos de diferenciación entre grupos<sup>24</sup>. Estos análisis se efectuaron mediante el programa Arlequín V.3<sup>25</sup>.

Para el estudio y comparación de los valores de FIQ entre genotipos, se ha evaluado, en primer lugar, si la variable FIQ sigue una distribución normal. Posteriormente, se han utilizado medidas descriptivas acompa-

ñadas de comparaciones entre grupos. Dichas comparaciones se han efectuado por medio del ANOVA seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. Para la realización de estos análisis se ha utilizado el programa estadístico SPSS V. 12.01 (SPSS Inc., 2003). En todos los análisis se consideró un nivel de significación del 5%.

## Resultados

### Caracterización del polimorfismo *COMT Val158Met* en controles y casos

La tabla 1 muestra las frecuencias de los genotipos del polimorfismo *COMT Val158Met* en controles y casos, considerando el total de individuos y separados por grupo  $\text{FIQ} < 70$  y  $\text{FIQ} \geq 70$ . En todos los grupos y subgrupos considerados, las frecuencias están de acuerdo con el teórico previsto por el equilibrio de Hardy-Weinberg (control:  $p = 0,848$ ; casos:  $p = 0,442$ ; casos  $\text{FIQ} < 70$ :  $p = 0,477$ ; casos  $\text{FIQ} \geq 70$ :  $p = 0,690$ ).

Como se observa en la tabla 1, la frecuencia de *Met/Met* es más baja en controles (20,91%) que en casos (34,55%) mientras que la de *Val/Val* es más alta en controles (30,91%) que en casos (20,00%), siendo las diferencias observadas significativas (tabla 2). Asimismo, puede observarse que hay diferencias entre casos  $\text{FIQ} < 70$  y  $\text{FIQ} \geq 70$ .

**TABLA 1. Frecuencias de los genotipos del polimorfismo *COMT Val158Met* en controles y casos, considerando el total de individuos y separados por grupo  $\text{FIQ} < 70$  y  $\text{FIQ} \geq 70$**

Genotipos	Control		Casos		Casos $\text{FIQ} < 70$		Casos $\text{FIQ} \geq 70$	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Val/Val</i>	34	30,91	22	20,00	20	28,17	2	5,13
<i>Val/Met</i>	53	48,18	50	45,45	32	45,07	18	46,15
<i>Met/Met</i>	23	20,91	38	34,55	19	26,76	19	48,72

FIQ: cuestionario de impacto de la fibromialgia.

**TABLA 2. Resultados de los tests exactos de diferenciación (valores de p), aplicados para comparar las frecuencias genotípicas entre grupos**

	Control	Casos	Casos $\text{FIQ} \geq 70$	Casos $\text{FIQ} < 70$
Control	—			
Casos	0,04841	—		
Casos $\text{FIQ} \geq 70$	0,00020	0,05393	—	
Casos $\text{FIQ} < 70$	0,68095	0,36208	0,00421	—

FIQ: cuestionario de impacto de la fibromialgia.

$\geq 70$  que también son significativas (tabla 2), y la frecuencia de *Met/Met* es casi el doble en caso con  $FIQ \geq 70$ . La comparación control/casos  $FIQ < 70$  evidencia la semejanza de las frecuencias de los 2 grupos (tabla 2), al revés de la comparación control/casos  $FIQ \geq 70$  que demuestra la presencia de diferencias significativas en las frecuencias de los 2 grupos (tabla 2).

### Relación entre genotipo *COMT* y valor de FIQ

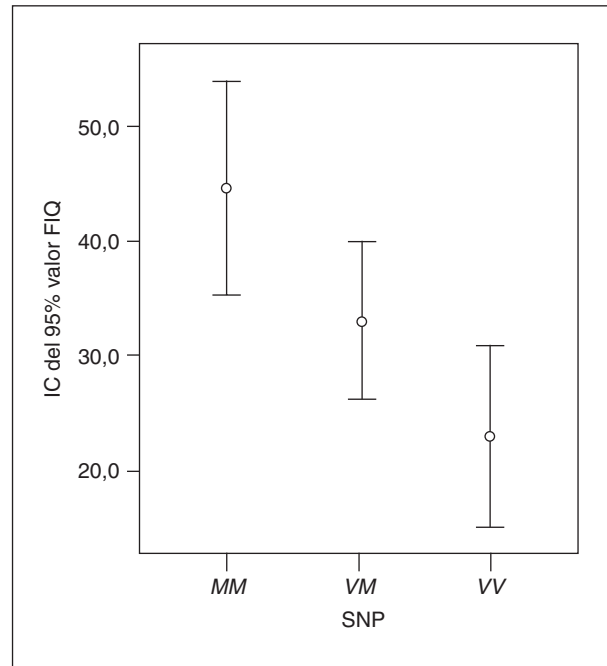
El valor de FIQ sigue una distribución normal, tanto si se analiza globalmente como para cada genotipo (Kolmogorov-Smirnov, total:  $Z = 1,242$ ,  $p = 0,091$ ; *Met/Met*:  $Z = 0,816$ ,  $p = 0,519$ ; *Val/Met*:  $Z = 1,053$ ,  $p = 0,217$ ; *Val/Val*:  $Z = 0,642$ ,  $p = 0,804$ ).

En las tablas se presentan las estadísticas descriptivas para la variable FIQ teniendo en cuenta los diferentes genotipos. Como se puede observar, los valores medios de FIQ son más altos en los genotipos *Met/Met* (71,67) y *Val/Met* (68,27) y más bajos en el genotipo *Val/Val* (58,00). La comparación de éstos entre los genotipos indica que hay diferencias en los valores de FIQ por lo menos entre 2 de los genotipos (ANOVA,  $F = 9,807$ ;  $p < 0,001$ ) y la utilización del test de Tukey de comparaciones múltiples indica que los valores de FIQ presentan diferencias significativas cuando se compara *Met/Met/Val/Val* (Tukey,  $p < 0,001$ ) y *Val/Val/Val/Met* (Tukey,  $p = 0,003$ ).

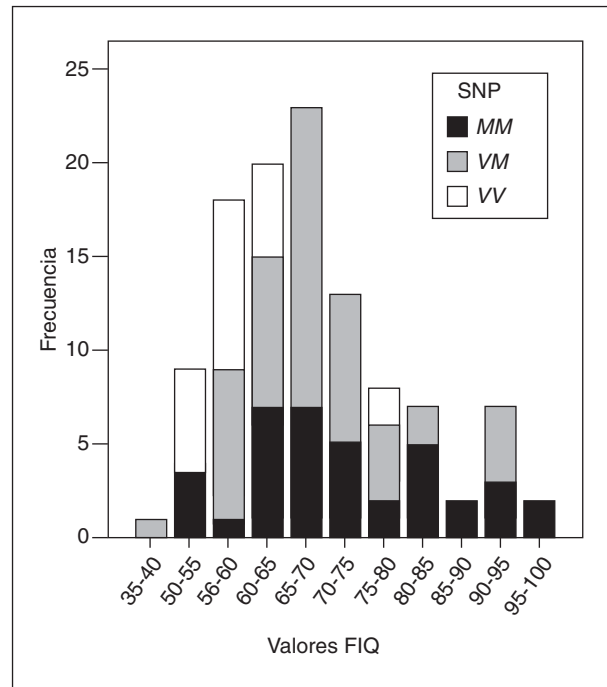
Como se desprende del análisis de los intervalos de confianza (fig. 1), es improbable que la media de FIQ del genotipo *Val/Val* tenga un valor  $> 70$ , mientras que para los genotipos *Val/Met* y particularmente *Met/Met* esta probabilidad es más elevada. Una impresión gráfica más amplia puede obtenerse con la observación de la figura 2 que relaciona la distribución de los valores del FIQ con los diferentes genotipos detectados.

### Discusión

La alta prevalencia de la FM hace de este síndrome un problema sociosanitario complejo<sup>26</sup>, acerca del que, independientemente del gran interés que ha suscitado en los últimos años en muchos grupos investigadores, hay grandes lagunas de conocimiento. Se formulan hipótesis que intentan explicar en todo o en parte los mecanismos fisiopatogénicos del síndrome que, según todo parece apuntar, sigue un modelo de enfermedad compleja<sup>27</sup>. En este contexto, diversas comorbilidades, signos y síntomas se han propuesto dado el interés en estratificar el impacto y la severidad del síndrome para cada paciente. Nuestro trabajo consolida publicaciones previas<sup>11</sup> en el sentido de que el genotipo homocigoto *Met/Met* es significativamente más frecuente en enfermos con FM que en controles, y la magnitud de la asociación es muy sólida ( $p = 0,048$ ).



**Figura 1.** Representación gráfica de los intervalos de confianza (IC) de la media del cuestionario de impacto de la fibromialgia (FIQ) para cada uno de los genotipos de *COMT*. SNP: polimorfismos de un único nucleótido.



**Figura 2.** Distribución de los valores del cuestionario de impacto de la fibromialgia (FIQ) y genotipos detectados. SNP: polimorfismos de un único nucleótido.



En segundo lugar, se relaciona de forma significativa ( $p = 0,004$ ) el polimorfismo homocigoto *Met/Met* con altos valores en el FIQ, dato de potencial relevancia clínica.

El mecanismo de incremento de la percepción del dolor por la reducción de la actividad enzimática de la *COMT* no se conoce, aunque se sugieren esencialmente 2 posibilidades, en primer lugar a través de la disminución en la producción de encefalinas en algunas regiones del cerebro, con disminución de la respuesta al estímulo directo de la sustancia P, y en segundo lugar mediante la estimulación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos como resultado de valores elevados de catecolaminas en el sistema nervioso central (SNC), como ocurre en los modelos animales.

En todo caso, serán necesarios futuros trabajos para precisar el mecanismo en los humanos, aunque se postula que determinados haplotipos que incluyen polimorfismos de un único nucleótido (SNP [*single nucleotide polymorphism*]) de efecto sinónimo pueden tener efectos sobre las proteínas que vayan más allá de los ahora conocidos a través de un mecanismo de sinergia<sup>1</sup>. Como limitaciones a nuestro estudio, citaremos que hubiese sido de interés valorar diferencias entre sexos, cosa que no ha sido posible por la distribución de la muestra. La valoración de la significación estadística de las diferentes escalas del FIQ, en relación con los polimorfismos detectados, y el diseño de un estudio lineal y prospectivo para determinar el valor pronóstico del genotipo *Met/Met* respecto a la severidad de la FM serían también, en nuestra opinión, interesantes planteamientos.

## Conclusiones

Nuestros resultados parecen indicar que el genotipo *Met/Met* está asociado a valores de FIQ más elevados.

**Fondos:** El citado trabajo se ha realizado con recursos económicos de la Fundación para la Fibromialgia y el Síndrome de Fatiga Crónica (<http://www.fundacionfatiga.org>) y de la Fundación Echevarne (<http://www.echevarne.com>).

## Bibliografía

1. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet.* 2005;14:135-43.
2. Wolfé F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990;33:160-72.
3. Andreu JL, Sanz J. La fibromialgia y su diagnóstico. *Rev Clin Esp.* 2005; 205:333-6.
4. Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:1040-5.
5. Staud R. New evidence for central sensitization in patients with fibromyalgia. *Curr Rheumatol Rep.* 2004;6:259.
6. Adler GK, Geenen R. Hypothalamic-pituitary-adrenal and autonomic nervous system functioning in fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005;31:187-202.
7. Martínez-Lavin M. Fibromyalgia as a sympathetically maintained pain syndrome. *Curr Pain Headache Rep.* 2004;8:385-9.
8. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. *COMT* val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science.* 2003;299:1240-3.
9. Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (*COMT*): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective *COMT* inhibitors. *Pharmacol Rev.* 1999;51:593-628.
10. García-Fructuoso FJ. Procedimiento para la utilización del polimorfismo del gen *COMT* (catecol-oxi-metiltransferasa) en el pronóstico de la gravedad de la fibromialgia. *Boletín Oficial de la Propiedad Industrial.* 2005; 2:16.
11. Gursoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alasehirli B, Erdal N. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int.* 2003;23:104-7.
12. Martínez-Lavin M, Ramos Kuri M, Hernández F. Exploring a genomic basis for fibromyalgia's dysautonomic nature: catechol-O-methyl transferase (*COMT*) val-158-met polymorphism. *Arthritis Rheum.* 2004;50: S548.
13. Armero P, Muriel C, Santos J, Sánchez-Montero FJ, Rodríguez RE, González-Sarmiento R. *COMT* (Val158Met) polymorphism is not associated to neuropathic pain in a Spanish population. *Eur J Pain.* 2005;9: 229-32.
14. Arnold LM, Hudson JL, Hess EV, Ware AE, Fritz DA, Auchenbach MB, et al. Family study of fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2004;50:944-52.
15. Yunus MB. Genetic factors in fibromyalgia syndrome. *Z Rheumatol.* 1998;57 Suppl 2:61-2.
16. Yunus MB, Khan MA, Rawlings KK, Green JR, Olson JM, Shah S. Genetic linkage analysis of multicase families with fibromyalgia syndrome. *J Rheumatol.* 1999;26:408-12.
17. Staud R. Predictors of clinical pain intensity in patients with fibromyalgia syndrome. *Curr Pain Headache Rep.* 2005;9:316-21.
18. Wolfé F. Stop using the American College of Rheumatology criteria in the clinic. *J Rheumatol.* 2003;30:1671-2.
19. Bennett R. The Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ): a review of its development, current version, operating characteristics and uses. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23:S154-62.
20. Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM. The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation. *J Rheumatol.* 1991;18:728-33.
21. Daniels JK, Williams NM, Williams J, Jones LA, Cardno AG, Murphy KC, et al. No evidence for allelic association between schizophrenia and a polymorphism determining high or low catechol O-methyltransferase activity. *Am J Psychiatry.* 1996;153:268-70.
22. Rivera J, González T. The Fibromyalgia Impact Questionnaire: a validated Spanish version to assess the health status in women with fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol.* 2004;22:554-60.
23. Guo S, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992;48:361-72.
24. Raymond M, Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution.* 1995;49:1280-3.
25. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online.* 2005;1:47-50.
26. Villanueva V, Valia J, Cerdà G. Fibromialgia: diagnóstico y tratamiento. El estado de la cuestión. *Rev Soc Esp Dolor.* 2004;11:50-63.
27. Goldenberg DL, Burckhardt C, Crofford L. Management of fibromyalgia syndrome. *JAMA.* 2004;292:2388-95.