



Università degli Studi di Napoli Federico II

**Tesi di dottorato di ricerca in fisiopatologia clinica e
medicina sperimentale**

XXIV CICLO

COORDINATORE: PROF. G. MARONE

**Interazione tra fattori ambientali e genetici nel
determinismo di fenotipi clinici complessi come diabete
mellito tipo 2 e complicanze, obesità e infiammazione
subclinica**

RELATORE:

DOTTORANDA:

Ch.ma Prof. Angela A. Rivellese

Dott.ssa Lapice Emanuela

Anno accademico 2010/2011

INDICE

Riassunto	3-4
Introduzione	5-14
Scopi	15-16
Metodi	17-18
Analisi statistiche	19
Studi	20-47
Discussioni generali e Conclusioni	48-49
Bibliografia	50-60
Appendice: Pubblicazioni	61-62

RIASSUNTO

Il grasso intraddominale e sottocutaneo addominale correla più strettamente del grasso totale, espresso con l'Indice di massa corporea, con le complicanze metaboliche dell'obesità come l'insulino-resistenza, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia ed in ultima analisi con il rischio cardiovascolare globale. L'inflammatione subclinica rappresenta un possibile legame tra obesità, diabete mellito tipo 2 e rischio cardiovascolare. La genesi di queste condizioni è prettamente multifattoriale; sia fattori legati allo stile di vita, quali cattive abitudini alimentari e riduzione dell'attività fisica, sia il background genetico hanno un ruolo determinante nell'influenzare la suscettibilità a queste malattie complesse. Attualmente non è ancora chiaro, per quanto riguarda l'inflammatione subclinica, il ruolo della adiposità addominale indipendentemente dalla adiposità generale sui valori di CRP, il principale marcatore di inflammatione subclinica. Inoltre, anche se è noto che il 50% dei valori di CRP sono geneticamente determinati, pochi studi sono stati condotti per valutare l'associazione della CRP con polimorfismi di geni candidati alla regolazione dell'inflammatione. Sono invece molto numerosi gli studi che valutano l'associazione di determinati polimorfismi, in particolare il polimorfismo Pro12Ala di PPAR γ 2, con l'obesità e le complicanze del diabete; tuttavia sono rari gli studi che valutano queste associazioni alla luce delle interazioni con i fattori ambientali e con altri geni. I lavori prodotti durante questo triennio di dottorato hanno dimostrato che il polimorfismo Pro12Ala di PPAR γ 2, in soggetti con diabete tipo 2, è associato ad una riduzione dell'escrezione urinaria di albumina ed ad una funzione renale complessivamente migliore rispetto ai non portatori della mutazione, indipendentemente dai principali fattori confondenti analizzati. La funzione protettiva sulla microalbuminuria è stata altresì confermata in una metanalisi effettuata su 6564 pazienti. La combinazione dei genotipi ProPro di PPAR γ 2 e di CT-TT di UCP3 è in grado di individuare soggetti che, a parità di dieta abituale, hanno un minore indice di massa corporea. L'adiposità addominale è

associata ad una maggiore infiammazione subclinica, indipendentemente dall'indice di massa corporea e questo può essere uno dei meccanismi che spiegano l'eccesso di rischio cardiovascolare associato all'adiposità addominale aldilà dei fattori di rischio tradizionali. Abbiamo, infine, per la prima volta, dimostrato l'associazione, significativa ed indipendente dai principali fattori ambientali, tra la CRP e il polimorfismo GG di UCP2 , gene fortemente candidato ad avere un ruolo nella infiammazione subclinica.

INTRODUZIONE

EPIDEMIOLOGIA DELL'OBESITA' E DEL DIABETE MELLITO

TIPO 2.

L'obesità è una malattia cronica ad eziologia multifattoriale caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo. L'obesità è fortemente associata all'ipertensione, alle dislipidemie, a diverse forme di tumore, alle malattie respiratorie, alla calcolosi biliare, ma in particolare alle malattie cardiovascolari e al diabete mellito tipo 2. E' stimabile che circa la metà dei soggetti obesi diventerà diabetico.

Obesità e diabete mellito tipo 2, prima considerati problemi solo dei paesi ricchi, sono ora drammaticamente in crescita anche nei paesi a basso e medio reddito. Attualmente nel mondo ci sono circa 400 milioni di adulti obesi e 220 milioni di soggetti con diabete mellito di tipo 2, numeri che sono destinati ad aumentare a 700 milioni e 366 milioni rispettivamente nel 2030 (WHO 2010, IDF 2010). In Italia dati dell'ISTAT, provenienti da archivi elettronici dei medici di medicina generale e da alcuni studi basati sul consumo di farmaci antidiabetici, indicano che la prevalenza della malattia ha superato il 5% (1). Su base nazionale questo indica che i diabetici noti in Italia sono circa 3 milioni, oltre ai quali si aggiunge una quota stimabile in circa un milione di persone che, pur avendo la malattia, non ne sono a conoscenza. In Italia l'obesità interessa l'11.1% degli uomini e il 9.2% delle donne.

Sia il diabete che l'obesità hanno un impatto sostanziale sulla mortalità; nel 2004 circa 112.000 morti negli Stati Uniti sono state attribuite ad un aumento delle malattie cardiovascolari risultanti dalla obesità (2) e, nello stesso anno, le complicanze del diabete sono state responsabili del 5% della mortalità globale (WHO 2010). Nel 2006 per la prima volta nel mondo le morti per il sovrappeso sono state superiori a quelle legate al sottopeso e il trattamento del diabete e delle complicanze dell'obesità è stato responsabile dell'8% di tutte le spese sanitarie della Comunità Europea. Nel 2010 il diabete ha determinato il 10-15% dei

costi dell'assistenza sanitaria in Italia. Ogni anno ci sono nel nostro paese circa 70.000 ricoveri per diabete causati principalmente da complicanze quali ictus cerebrale, infarto del miocardio, retinopatia diabetica, insufficienza renale ed amputazione degli arti inferiori. L'OMS ha inserito quindi il diabete e l'obesità fra le patologie su cui maggiormente investire per la prevenzione, dato il crescente peso assunto da queste patologie anche nei paesi in via di sviluppo, e vista la possibilità di attuare misure preventive efficaci e di basso costo.

CLASSIFICAZIONE DELL'OBESITA'

L'Obesità viene attualmente classificata utilizzando l'indice di massa corporea (BMI) calcolato come il rapporto tra il peso in kg e l'altezza in metri elevata al quadrato (kg/m^2). Nella popolazione adulta si definisce sovrappeso un valore di BMI compreso tra 25.0 e 29.9 Kg/m^2 , mentre valori $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ sono indicativi di obesità. Il BMI, tuttavia, non è la misura antropometrica che correla meglio con il rischio di diabete, di malattie cardiovascolari e di morte associati all'obesità (3-4). Il grasso intraddominale e sottocutaneo addominale correla più strettamente con le complicanze metaboliche dell'obesità come l'insulino-resistenza, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia ed in ultima analisi con il rischio cardiovascolare globale. Misure di adiposità addominale sono la circonferenza vita e il rapporto circonferenza vita/circonferenza fianchi. Si definiscono soggetti con adiposità addominale quelli che hanno una circonferenza vita > 102 cm negli uomini e > 88 cm nelle donne o un rapporto vita/fianchi > 0.9 negli uomini e > 0.85 nelle donne (5). L'aumento di rischio cardiometabolico globale e di diabete mellito tipo 2 legato all'adiposità addominale non è del tutto noto; meccanismi, poco esplorati, potrebbero spiegare la quota residua di rischio al di là dei fattori di rischio tradizionali, uno di questi meccanismi potrebbe essere l'infiammazione subclinica (6)

INFIAMMAZIONE SUBCLINICA ED INSULINORESISTENZA

L' infiltrazione di cellule del sistema immunitario nel tessuto adiposo conduce alla infiammazione subclinica che è in parte responsabile della patogenesi dell' insulino – resistenza nell' obesità (7).L' insulino –resistenza è definita come un' inadeguata risposta da parte dei tessuti sensibili all'insulina a normali livelli di insulinemia (8).Lo stato di insulinoresistenza è caratterizzato dalla mancata inibizione della produzione epatica di glucosio, da una ridotta captazione di glucosio da parte del muscolo scheletrico e da un aumento della lipolisi, fenomeni che conducono ad iperglicemia (9). Un' iperglicemia, anche lieve, è causa di una stimolazione funzionale sul pancreas, che aumenta la produzione di insulina (iperinsulinemia compensatoria). Ciò mantiene, almeno inizialmente, normali i livelli plasmatici di glucosio. Nei soggetti predisposti, dopo un certo periodo, l'incapacità delle cellule β pancreatiche a continuare questa risposta di aumentato rilascio dell'ormone causa il diabete.

Negli ultimi anni sono stati individuati alcuni dei meccanismi molecolari tramite cui l' infiammazione subclinica cronica potrebbe causare insulino-resistenza . Le citochine infiammatorie ed in particolare il TNF α e l' IL6 riducono la trasmissione del segnale insulinico e si associano ad insulino resistenza, diabete mellito tipo 2 ed incidenza di complicanze macrovascolari in pazienti con diabete tipo 2 (10,11) . E' stato dimostrato che l'IL 6 è prodotta in maniera proporzionale all'espansione della massa adiposa, in particolare del tessuto adiposo viscerale (12,13). L' IL6 è il principale determinante della produzione negli epatociti della Proteina C reattiva (CRP) . La CRP è il marcatore di infiammazione subclinica più comunemente utilizzato ed è un marcatore di rischio cardiovascolare indipendente anche dai valori di colesterolo LDL (14). La CRP inoltre è un predittore indipendente di diabete mellito, di macroangiopatia e di complicanze microangiopatiche del diabete quali la nefropatia diabetica e la neuropatia (15-20).

L'adiposità è il principale determinante dei valori di CRP, ma non è chiaro negli studi precedentemente effettuati, se sia più il grasso totale ad incrementare i valori di CRP o la sua distribuzione, in particolare a livello addominale (21-24). La valutazione del ruolo dell'adiposità addominale, indipendentemente da quella generale, sull'infiammazione subclinica è utile in quanto può fornirci una spiegazione dell' aumento di rischio cardiovascolare legato all' adiposità addominale non ancora spiegato dai classici fattori di rischio. Oltre all'adiposità, fattori genetici hanno un ruolo fondamentale nel determinismo dei valori di CRP; è stimabile, infatti, che il 50% dei valori di CRP siano geneticamente determinati (25,26).

EZIOPATOGENESI DELL'OBESITA': Ruolo dei Fattori di rischio ambientali e genetici

La genesi dell'obesità è prettamente multifattoriale. Fattori legati allo stile di vita, quali cattive abitudini alimentari e riduzione dell'attività fisica, sono risultati associati all' aumento della prevalenza della obesità e del diabete mellito tipo 2. In particolare una dieta occidentale ad alta densità calorica, ricca di carne rossa, cibi raffinati, grassi saturi e trans incrementa il rischio di obesità e diabete mellito tipo 2 (27)

E' noto, comunque, che alcuni soggetti sono più suscettibili agli effetti deleteri di uno stile di vita sbagliato rispetto ad altri; un gene o una combinazione di geni può rendere un soggetto più suscettibile ad un determinato ambiente (28). Gli studi condotti su gemelli ci forniscono un interessante dimostrazione del ruolo della genetica nel determinismo del peso corporeo . E' stata ,infatti, dimostrata una concordanza del BMI tra le coppie di monozigoti cresciuti e vissuti in ambienti differenti, inoltre la concordanza del BMI è molto maggiore con i genitori biologici che con i genitori adottivi. E' stimato che almeno il 50% della variabilità interindividuale del BMI è legata a fattori genetici (29). Esistono singole mutazioni che

causano obesità (obesità monogenica), tuttavia queste forme di obesità sono rare, molto severe, e in genere hanno inizio durante l'infanzia.

Nelle forme comuni di obesità (obesità poligenica) sembra probabile che numerosi varianti genetiche interagiscono con un ambiente "a rischio". Il contributo di ogni singolo gene coinvolto, preso singolarmente, sembra essere modesto, tuttavia la combinazione di diversi geni, in presenza di condizione ambientali predisponenti, può spiegare gran parte del fenotipo clinico in esame.

Lo studio della genetica delle malattie complesse può essere molto utile sia a livello di popolazione, per permettere di indirizzare le politiche di salute di un paese, sia per l'individuo, perché la conoscenza di una predisposizione può guidare interventi mirati e precoci; inoltre l'approfondimento della genetica delle malattie complesse può migliorare la conoscenza della funzione di determinati geni e del motivo per cui l'evoluzione li ha selezionati fino ad oggi.

I geni che maggiormente sono stati correlati all'obesità sono quelli che regolano l'adipogenesi, in particolare il $PPAR\gamma$, la respirazione mitocondriale, in particolare l'UCP3 e l'UCP2, il turnover lipidico, la funzione autocrina ed endocrina del tessuto adiposo(30).

(Tabella 1)

Table 1 Candidate genes for common obesity in human adipose tissue

<i>Chromosome</i>	<i>Gene</i>	<i>Chromosome</i>	<i>Gene</i>
<i>Adipogenesis</i>		<i>Mitochondrion and energy expenditure</i>	
1q21.2	LMNA	4p15.1	PGC1A
2p21	Lipin	4q28–q31	UCP1
2q14.1	INSIG2	5q32	PGC1B
3p25–p2	PPARG	11q13	UCP2
5q31.3	GR	11q13	UCP3
12q13	WNT10	11q13	ESRRA
16q22–16q24	FOXC2	18p11.2	CIDEA
17p11.2	SREBP1		
<i>Lipid turnover</i>		<i>Adipokines</i>	
5q32–q3	ADRB2	1q21	IL6R
8p12–p11.2	ADRB3	3q27	APM1
10q24–q26	ADRB1	6p21.3	TNFA
12p13	GB3	7p21	IL6
15q26	PLIN	7q21.3–q22	PAI-1
19q13	HSL	7q22.2	Visfatin
<i>Insulin signalling</i>		7q31.3	Leptin
3q27	AHSG	19p13.2	Resistin
6q22–q2	ENPP1		
10q23.3–q24.1	SORBS1		

Bold text denotes strong candidate genes for obesity based on established function in adipocytes and/or strong evidence of genetic association.

PPARS

I PPARs sono membri di una superfamiglia di recettori nucleari, la cui attività è regolata dal legame diretto con steroidi, ormoni tiroidei, vitamine, metaboliti lipidici.

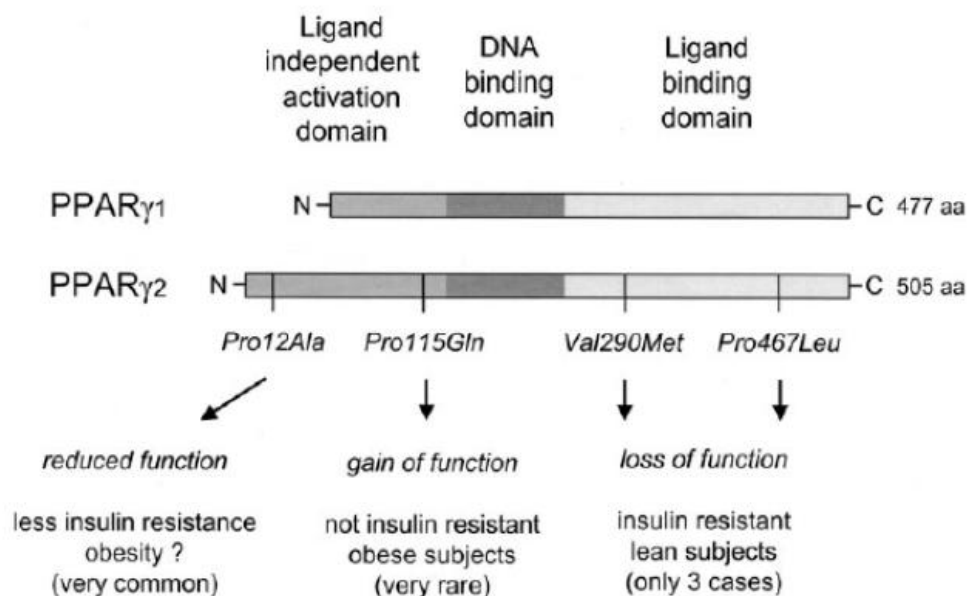
Sono stati descritti tre sottotipi di PPARs: PPAR α , PPAR γ , PPAR δ .

I PPAR α e i PPAR δ regolano i geni coinvolti nel metabolismo lipidico e, i fibrati, farmaci comunemente utilizzati per il trattamento delle dislipidemie, sono ligandi del PPAR α . Di PPAR γ , a causa di un processo di splicing alternativo, si conoscono 4 isoforme γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, di queste la γ 2 contiene un esone addizionale di 28 amminoacidi all' N terminale ed è particolarmente espresso a livello del tessuto adiposo. I ligandi naturali del PPAR γ sono gli acidi grassi e gli eicosanoidi, i ligandi sintetici includono i glitazonici, farmaci utilizzati per

ridurre l' insulino resistenza e l' iperglicemia nei pazienti diabetici di tipo 2 (31). Il PPAR γ promuove la differenziazione dei preadipociti ad adipociti maturi; inoltre favorisce l'uptake di acidi grassi circolanti nel tessuto adiposo migliorando l' insulinoresistenza.

Recenti osservazioni hanno mostrato che topi knock-out per il PPAR γ non sviluppano il tessuto adiposo, a dimostrazione che il PPAR γ è essenziale per la formazione di nuovi adipociti (32). Nell'uomo, i livelli di mRNA del PPAR γ sono incrementati negli adipociti di soggetti obesi, mentre l'espressione del PPAR γ è ridotta nel tessuto adiposo viscerale di soggetti magri (33). Pertanto, esso è un gene candidato per la regolazione del peso corporeo, ed interessante per gli studi di interazione geni-dieta (34). A carico del PPAR γ 2 sono state individuate diverse mutazioni (Figura 1) tra cui una mutazione missense risultante in una sostituzione di una Prolina con una Alanina al codone 12 (Pro12Ala) è relativamente più frequente (35).

Figura 1 : Mutazioni al locus del PPAR γ 2



Questa variante genetica, che rende il recettore meno attivo per i ligandi naturali e sintetici, ha mostrato influenzare con risultati contrastanti la regolazione del peso corporeo (36), la risposta alla dieta (37,38), la suscettibilità al diabete mellito tipo 2 (39,40) e alla nefropatia diabetica (41-43)

PROTEINE DISACCOPPIANTI :UCP3 E UCP2

Negli organismi eucarioti a livello dei mitocondri avviene l'ossidazione dei substrati. La catena di trasporto degli elettroni è situata nella membrana interna dei mitocondri, all'interno dei quali accetta atomi di idrogeno dalle molecole donatrici, e trasporta gli elettroni, attraverso i vari complessi, verso l'accettore finale e cioè l'ossigeno. I vari trasportatori sono disposti in maniera tale da avere potenziali di riduzione crescenti e per questo motivo gli elettroni, venendo trasportati, passano da uno stato energetico più alto ad uno stato energetico più basso con conseguente liberazione di energia, la quale verrà utilizzata in parte per la sintesi di ATP. Le proteine disaccoppianti (UCP) sono localizzate a livello della membrana interna del mitocondrio e hanno la funzione di dissipare il gradiente transmembrana riducendo la formazione di ATP, rilasciando energia solo sotto forma di calore (44)

Esistono 5 membri della famiglia delle uncoupling proteins ,da UCP1 a UCP 5, di queste l'UCP3 è espressa maggiormente a livello del tessuto muscolare scheletrico, il sito maggiore della termogenesi negli esseri umani, e ciò la rende particolarmente interessante per gli sulla regolazione del peso e sul metabolismo energetico .Un polimorfismo risultante in una sostituzione in posizione 55 di una Alanina con una Valina è stato associato ad un incremento del 58% dell'espressione dell' mRNA di UCP3 nel muscolo scheletrico degli Indiani Pima e si è dimostrato correlare positivamente con il metabolismo basale e negativamente con il BMI (45,46). Oltre al noto ruolo nella termogenesi UCP3 ha un ruolo chiave nell' ossidazione dei lipidi e nel frazionamento dell' energia(47,48)

L'UCP 2 è espresso in particolare nella milza, nel polmone, macrofagi e cellule T, e questo suggerisce un suo particolare ruolo, oltre che nel metabolismo, nella regolazione della infiammazione e della immunità (49). Inoltre l'UCP 2 agisce come down regolatore della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS), che inducono danno endoteliale, che, a sua volta, promuove il processo di aterosclerosi (50,51). I ROS, inoltre, aumentano la trascrizione di NFκB, che regola la produzione di citochine infiammatorie quali IL1, IL6 ed IL 8 (52). Il polimorfismo G(-866)A di UCP2 è un polimorfismo funzionale con l'allele G associato ad una riduzione dell'espressione di mRNA, suggerendo una ridotta protezione dalla produzione di ROS e quindi uno stato proinfiammatorio e lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi; questo polimorfismo è stato altresì associato ad un aumentato rischio di obesità, di malattie infiammatorie croniche e aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti con diabete mellito tipo 2 (53-55).

INTERAZIONI GENE-AMBIENTE E GENE-GENE

Gli studi che esaminano l'associazione di un gene con una malattia complessa si limitano spesso a valutare la frequenza di un determinato allele polimorfico nel gruppo dei soggetti affetti dalla patologia confrontato con i non affetti. I risultati di questi studi sono spesso non replicabili, perché hanno un potere statistico non sufficiente, sono condotti in soggetti di etnie diverse e soprattutto non considerano le interazioni tra fattori genetici ed ambientali e tra più geni tra di loro. La non corretta valutazione dei fattori ambientali può condurre ad un'errata stima del rischio di patologia, perché un polimorfismo, che mostra non aver alcun effetto sulla patologia esaminata in determinate condizioni ambientali, potrebbe avere un importante ruolo in altre condizioni (56). Ad esempio è stato dimostrato, in un nostro precedente studio (38), che il polimorfismo Pro12Ala era associato ad un maggiore BMI rispetto ai non portatori del polimorfismo solo in presenza di un ambiente "obesogeno", cioè solo quando i soggetti si trovavano nel quartile più elevato di assunzione calorica e non quando introducevano meno

calorie con la dieta. Inoltre un polimorfismo che preso singolarmente può influenzare scarsamente la patologia in esame, in combinazione con polimorfismi di altri geni può spiegare una buona parte della variabilità del tratto in esame.

SCOPI

Da quanto detto finora si evince l'importanza della infiammazione subclinica come possibile legame tra obesità, diabete mellito tipo 2 e rischio cardiovascolare; inoltre si evince il ruolo fondamentale del background genetico nell'influenzare la suscettibilità a queste malattie complesse. Attualmente non è ancora chiaro, per quanto riguarda l'infiammazione subclinica, il ruolo della adiposità addominale indipendentemente dalla adiposità generale sui valori di CRP. Inoltre, anche se è noto che il 50% dei valori di CRP sono geneticamente determinati, pochi studi sono stati condotti per valutare l'associazione della CRP con polimorfismi di geni candidati alla regolazione della infiammazione. Sono invece molto numerosi gli studi che valutano l'associazione di determinati polimorfismi, in particolare il Pro12Ala, con l'obesità e le complicanze del diabete; tuttavia sono rari gli studi che valutano queste associazioni alla luce delle interazioni con i fattori ambientali e con altri geni. Per questo motivo la mia attività di ricerca durante questo triennio di dottorato si è focalizzata, per quanto riguarda l'infiammazione subclinica, nella valutazione:

- 1) dell'effetto indipendente sui valori di proteina C reattiva, il principale marcatore dell'infiammazione subclinica, della adiposità generale e addominale.
- 2) dell'associazione tra CRP e il polimorfismo G(-866)A di UCP2, gene candidato ad avere un ruolo nella infiammazione.

Per quanto riguarda, invece, l'associazione tra il Pro12Ala di PPAR γ 2 con l'obesità e le complicanze del diabete abbiamo valutato in una popolazione di soggetti con diabete mellito tipo 2:

- 1) l'associazione di questo polimorfismo con la nefropatia diabetica

2) l'effetto del Pro12Ala sul BMI indipendentemente e combinato al polimorfismo-55 CT-TT di UCP 3.

Sono state valutate attentamente in questi studi le variabili ambientali, in particolare la dieta abituale dei soggetti in studio, l'attività fisica e l'uso di farmaci.

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati effettuati 5 studi di cui riporterò i dettagli nei capitoli seguenti. Gli studi effettuati hanno dato luogo a 4 lavori pubblicati ed 1 sottomesso ad una rivista scientifica, ancora non pubblicato (riportati in appendice).

METODI

Nei diversi studi sono state valutate :

Variabili antropometriche. L'altezza e il peso sono stati misurati senza scarpe, in accordo con un protocollo standard. E' stato calcolato il BMI (peso (kg) / altezza (m²). La circonferenza vita è stata misurata a livello della naturale depressione tra la decima costa e la cresta iliaca, a fine espirazione. E' stata misurata la circonferenza fianchi.

Pressione arteriosa. La pressione arteriosa è stata misurata al braccio destro in posizione supina, dopo cinque minuti di riposo; sono state effettuate tre letture, e nelle analisi è stata utilizzata la loro media.

Variabili biochimiche. La glicemia a digiuno, i trigliceridi, il colesterolo totale e l'HDL sono stati misurati con metodi enzimatico-colorimetrici di routine. I valori di LDL-colesterolo sono stati calcolati con la formula di Friedewald per soggetti con trigliceridi < 400 mg/dl. L'emoglobina glicosilata è stata determinata con HPLC. L'insulina è stata misurata con metodo radioimmunologico con doppio anticorpo. HOMA IR è stato calcolato come $[\text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glicemia (mmol/L)}] / 22,5$.

La microalbuminuria è stata misurata in una singola occasione sulle urine del mattino con il metodo ELISA ed è stata espressa come rapporto albumina/creatinina; sono state misurate l'urea e la creatinina plasmatiche, il filtrato glomerulare è stato stimato mediante la formula MRDR (Modification of Diet in renal disease) (57).

La CRP è stata misurata con un metodo ad elevata sensibilità (Tina-Quant, Roche/Hitachi 904) su campioni congelati di plasma trattato con EDTA.

Abitudini alimentari. La dieta abituale, definita come media dell'introito dell'anno precedente, è stata valutata utilizzando un questionario standardizzato e validato di tipo food frequency, con 138 diversi alimenti, somministrato da dietiste esperte (58,59). In breve, veniva chiesto ai pazienti in media quanto spesso consumassero una porzione di un dato alimento nell'anno precedente. L'assunzione di un dato nutriente veniva calcolata

moltiplicando la quantità di quel nutriente contenuta in una specifica porzione di alimento per la frequenza del suo consumo. I valori di energia e nutrienti dei cibi sono stati presi dalle tabelle dell' Istituto Europeo di Oncologia (60). Sono stati calcolati: l'introito energetico, (Kcal/giorno), i grassi totali, saturi and polinsaturi (g/giorno) e il rapporto polinsaturi/saturi(P/S).

Attività fisica. La spesa energetica legata all' attività fisica è stata valutata mediante un questionario standardizzato (61). Ai partecipanti è stato chiesto di compilare un questionario sulla loro abituale attività fisica sia al lavoro che durante il tempo libero, considerando quattro incrementali livelli di attività. Per gli scopi analitici i soggetti che si trovavano ai due livelli più bassi di attività fisica venivano definiti "sedentari", quelli nei due livelli più alti venivano definiti "attivi". L' utilizzo dei farmaci è stato chiesto nell' intervista.

Genotipizzazione. Il DNA è stato isolato dal sangue intero usando il Biorobot EZ1 Qiagen. Tutti i soggetti sono stati genotipizzati per i polimorfismi 55C/T (rs1800849) nella regione del promotore dell'UCP3, per il polimorfismo Pro12Ala (rs1801282) nel primo esone di PPAR γ 2 e per il polimorfismo G(-866)A (rs659399) nella regione del promotore dell'UCP2 con la polymerase chain reaction (PCR) utilizzando Realtime su ABI PRISM 7000 (PE Applied Biosystem). Per assicurare l'accuratezza della genotipizzazione il laboratorio ha ricevuto 18 campioni (5%) duplicati in cieco, che sono risultati totalmente concordanti.

ANALISI STATISTICHE

I dati sono riportati come media \pm deviazione standard o come percentuali. Le analisi delle variabili distribuite in maniera non normale sono state effettuate dopo la trasformazione logaritmica, al fine di normalizzarne la distribuzione. Il test X^2 goodness-of-fit test è stato utilizzato per valutare la deviazione delle frequenze dei genotipi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. La correlazione tra le variabili è stata valutata mediante l'analisi di correlazione di Pearson. Il confronto tra le medie è stato eseguito mediante T Test per dati non appaiati o analisi della varianza. Il confronto delle proporzioni è stato eseguito mediante le tavole di contingenza e l'analisi del X^2 . Analisi di regressione lineare o logistica sono state utilizzate per valutare l'effetto indipendente sulla variabile dipendente del genotipo e delle principali variabili analizzate. Nella metanalisi l'eterogeneità degli studi e la possibile presenza di bias di selezione sono stati valutati mediante il Cochran's Q test e la regressione lineare di Egger. Il Random effects model e la metaregressione sono stati utilizzati per stimare gli Odds ratio e per esplorare l'eterogeneità. Gli Odds ratio sono presentati con i limiti di confidenza (CI) al 95%. La significatività statistica è stata definita con valori di $p < 0.05$. Le analisi statistiche sono state condotte con SPSS for Windows (Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows version 16.0) e con Comprehensive Meta-Analysis(Biostat).

STUDIO 1

L'adiposità addominale è associata ad elevati livelli di Proteina C Reattiva indipendentemente dall'indice di massa corporea in soggetti sani e non obesi.

(Lavoro pubblicato su Diabetes Care 2009; 32(9):1734-6)

INTRODUZIONE

Molti studi hanno dimostrato che misure di adiposità addominale quali la circonferenza vita e il rapporto circonferenza vita/ circonferenza fianchi sono maggiormente associate al rischio di diabete e di malattie cardiovascolari rispetto a misure di adiposità generale come l' indice di massa corporea (3,4). L' aumento di rischio cardiometabolico associato all'obesità addominale è solamente in parte spiegato dai maggiori fattori di rischio cardiovascolari, un importante ruolo aggiuntivo può essere attribuito all' infiammazione subclinica (5). Tra i marker di infiammazione subclinica la Proteina C reattiva (CRP) è quella che meglio predice il rischio cardiovascolare, predicendo eventi cardiovascolari, anche in soggetti che non hanno valori di colesterolo aumentato (14). Diversi studi hanno valutato la relazione della CRP con gli indici di adiposità addominale e generale, ma non hanno chiarito il contributo indipendente di ciascuna di esse , anche perché gli studi erano stati condotti su pazienti obesi, nei quali è più difficilmente valutabile il diverso impatto dell' adiposità addominale e generale (21-24). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'impatto dell'adiposità addominale sui livelli plasmatici di CRP indipendentemente dalla adiposità generale in un gruppo di soggetti sani, non obesi.

SOGGETTI

Abbiamo utilizzato un modello di tipo caso-controllo. Da una popolazione di 1252 lavoratori di una Società telefonica di Napoli, che hanno partecipato ad un programma di screening cardiovascolare, abbiamo selezionato 350 soggetti consecutivi con adiposità addominale (casi) definita come un rapporto vita/fianchi ≥ 0.9 negli uomini e ≥ 0.85 nelle donne e 199 soggetti senza adiposità addominale (controlli) definita come un rapporto vita/fianchi < 0.9 negli uomini e < 0.85 nelle donne ; i due gruppi sono stati selezionati in modo che fossero comparabili per BMI ($\pm 1 \text{ kg/m}^2$), età (± 5 anni) e sesso. I criteri di esclusione sono stati: diabete, BMI > 35 o $< 20 \text{ kg/m}^2$, uso di statine o farmaci antinfiammatori non steroidei, infezioni acute o croniche, e precedente malattia cardiovascolare

RISULTATI

Per effetto della selezione effettuata non vi erano differenze tra i casi e i controlli né di età , né di BMI, mentre la circonferenza vita e il rapporto vita/fianchi erano significativamente maggiori nei casi . La CRP era correlata significativamente con il BMI sia nei casi ($r=0.23$, $p<0.01$) che nei controlli ($r= 0.17$, $p<0.02$). La CRP era significativamente più elevata in soggetti con adiposità addominale rispetto a soggetti senza adiposità addominale a parità di indice di massa corporea. In accordo con questo dato, anche la proporzione di soggetti con CRP $> 3 \text{ mg/L}$, valore che in molti studi prospettici è stato associato ad un elevato rischio cardiovascolare, era significativamente più elevata nei casi che nei controlli (Tabella 2). Inoltre i soggetti con adiposità addominale avevano un profilo cardiometabolico peggiore paragonato ai soggetti senza adiposità addominale, ma con il medesimo indice di massa corporea. In particolare i soggetti con adiposità addominale avevano valori significativamente più alti di trigliceridi, pressione arteriosa, uricemia , HOMA-IR; valori significativamente più bassi di colesterolo HDL ed una prevalenza doppia di sindrome metabolica (Tabella 2).

Tabella 2 : Valori di CRP e profilo di rischio cardiovascolare in soggetti con e senza adiposità addominale

	Without visceral adiposity	With visceral adiposity	P
<i>n</i>	199	350	
Age (years)	44.9 ± 6.4	44.7 ± 6.2	NS
Male sex	76.4	85.7	0.01
BMI (kg/m ²)	24.8 ± 2.5	24.7 ± 2.2	NS
Waist circumference (cm)	83.3 ± 6.7	96.4 ± 6.0	0.01
WHR	0.85 ± 0.05	1.07 ± 0.08	0.01
CRP (mg/dl)	1.53 ± 1.74	1.96 ± 2.16	0.04
HDL cholesterol (mg/dl)	49.6 ± 12.8	45.29 ± 12.6	0.01
Triglycerides (mg/dl)	116 ± 59	149 ± 81	0.01
Uric acid (mg/dl)	4.5 ± 1.1	4.8 ± 1.6	0.01
Systolic blood pressure (mmHg)	132 ± 15	135 ± 16	0.02
Diastolic blood pressure (mmHg)	84 ± 9	87 ± 9	0.01
HOMA-IR	1.77 ± 0.90	1.99 ± 1.21	0.03
Fibrinogen (mg/dl)	302 ± 62	295 ± 61	NS
Proportion with CRP >3 mg/dl	10.1	21.4	0.01
Current smokers	50.8	52.0	NS
Former smokers	22.6	27.1	NS
Proportion with metabolic syndrome	10.1	25.9	0.01

Data are means ± SD or % unless otherwise indicated. NS, not significant.

L'analisi multivariata confermava una significativa associazione tra CRP ed adiposità addominale indipendentemente da BMI, sesso, età e fattori di rischio cardiovascolare.

DISCUSSIONE

Il nostro studio ha dimostrato che in soggetti non obesi la CRP è significativamente associata all'adiposità addominale indipendentemente dal BMI. Inoltre i soggetti con adiposità addominale presentano, come atteso, un peggiore profilo di rischio cardiovascolare, anche a parità di BMI. L' aumento dell'infiammazione subclinica nei soggetti con adiposità addominale può in parte spiegare l'eccesso di rischio cardiovascolare associato a questo tipo di adiposità. Il BMI correla, nel nostro studio, significativamente con la CRP sia nei casi che nei controlli, questo dato è in accordo con i dati della letteratura e conferisce consistenza ai nostri risultati. Il modello di tipo caso-controllo usato nello studio è particolarmente efficiente per correggere per BMI e non è stato utilizzato negli studi precedenti.

La CRP è un marcatore di rischio cardiovascolare anche nei soggetti con valori colesterolo LDL non elevato (14), poiché le statine riducono sia la CRP, che il colesterolo, la misurazione di questo biomarker può essere utile per identificare quali soggetti possono beneficiare delle statine, al di là dei loro effetti ipocolesterolemizzanti. Inoltre, data la forte associazione tra rapporto vita fianchi e CRP, indipendentemente dal BMI, e, vista la difficoltà della misurazione routinaria della CRP, il rapporto vita- fianchi ,eseguibile molto facilmente, potrebbe essere utilizzato per selezionare quei pazienti nei quali è più appropriato misurare la CRP. I nostri risultati supportano, inoltre, le raccomandazioni di misurare sempre nei soggetti con indice di massa corporea tra 25.0-34.9 la circonferenza vita o il rapporto vita/fianchi al fine di individuare i soggetti con rischio cardiovascolare più aumentato .

STUDIO 2

Il polimorfismo -866 G/A di UCP2 è associato con livelli plasmatici di proteina C reattiva in soggetti con diabete tipo 2

(Lavoro pubblicato su Cardiovascular Diabetology 2010, 9:68)

INTRODUZIONE

La proteina C reattiva è una proteina della fase acuta dell' infiammazione sintetizzata dal fegato ed è un marker indipendente di malattia cardiovascolare (14). Anche se l'adiposità, in particolare quella addominale, come noi stessi abbiamo dimostrato, è il principale determinante dei valori della CRP, vi sono evidenze, specialmente in studi condotti su gemelli monozigoti, che il 35-50% della variabilità della CRP sia geneticamente determinata. (25,26)

L' UCP2 è una proteina mitocondriale disaccoppiante che agisce anche come down regolatore della produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), che hanno un ruolo chiave nello sviluppo e progressione dell'aterosclerosi (50). Il polimorfismo G(-866)A di UCP2 è un polimorfismo funzionale con l' allele G associato ad una riduzione dell' espressione di mRNA, suggerendo una ridotta protezione dalla produzione di ROS ; questo polimorfismo è stato altresì associato ad un aumentato rischio di malattie infiammatorie croniche e aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti con diabete mellito tipo 2 (53-55). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la relazione tra CRP e il polimorfismo G(-866)A di UCP2, relazione mai esplorata in letteratura, che ci può aiutare nella comprensione dei possibili meccanismi che legano questo polimorfismo e il rischio cardiovascolare.

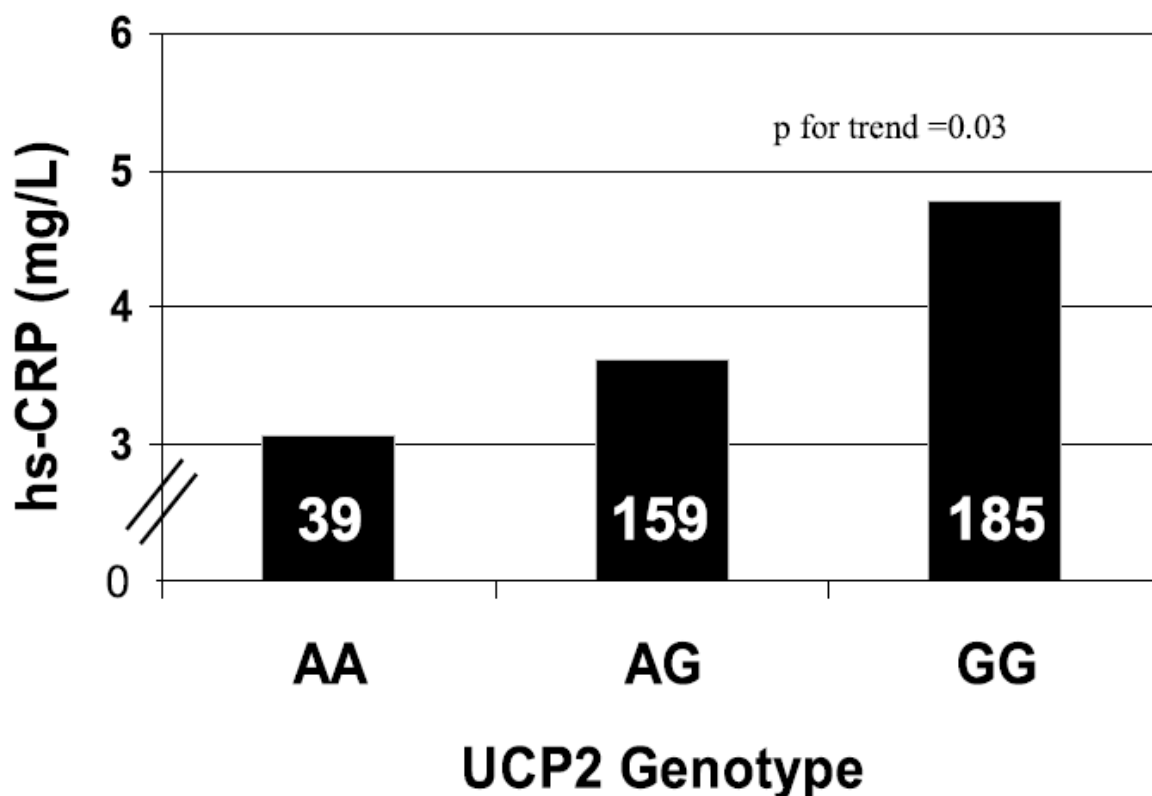
SOGGETTI

Abbiamo reclutato presso due centri italiani (Napoli e Torino) 383 pazienti consecutivi con diabete mellito tipo 2, che afferivano all' ambulatorio per lo screening delle complicanze del diabete. Criteri di inclusione erano il diabete mellito tipo 2 secondo la classificazione WHO ed un' età compresa tra 40-70 anni. Abbiamo escluso soggetti con insufficienza renale o epatica, malattie autoimmuni, uso di statine o farmaci antinfiammatori non steroidei, infezioni acute o croniche, e precedente malattia cardiovascolare.

RISULTATI

La distribuzione dei genotipi di UCP2 era all' equilibrio di Hardy Weinberg . 10.2% dei partecipanti erano AA, 41.5 % erano AG e 48.3% erano GG. Come è possibile osservare nella figura 2 la CRP si incrementava progressivamente e significativamente nei 3 genotipi essendo più bassa per i soggetti con il genotipo AA, intermedia in quelli con AG, e più alta in quelli con il genotipo GG, suggerendo un effetto gene-dose.

Figura 2 : Concentrazione della CRP secondo il genotipo di UCP2



Nelle analisi successive, per la scarsa numerosità dei soggetti con genotipo AA, abbiamo considerato i soggetti AA e AG come un unico gruppo. Abbiamo dimostrato che i soggetti con genotipo GG rispetto a quelli con AA+AG avevano valori di CRP significativamente più elevati, ed una maggiore proporzione di soggetti con CRP > 2 mg/L, valore associato in letteratura ad un aumento del rischio cardiovascolare. I pazienti portatori del genotipo GG e non portatori erano per il resto perfettamente comparabili in termini di età, sesso, antropometria, compenso glicemico, lipidi plasmatici, fumo di sigaretta o terapia ipoglicemizzante (Tabella 3).

Tabella 3: Caratteristiche dei partecipanti secondo il genotipo di UCP2

UCP 2 G(-866)A polymorphism	AA+AG (N 198)	GG (N 185)	p
Age (years)	58.2 ± 7.5	58.0 ± 8.2	0.78
Males (%)	52.5	47.5	0.22
BMI (kg/m ²)	30.5 ± 5.9	30.9 ± 5.8	0.46
Waist circumference (cm)	100.9 ± 11.9	101.2 ± 12.0	0.82
Total cholesterol (mg/dl)	197.9 ± 37.9	205.2 ± 43.9	0.09
HDL cholesterol (mg/dl)	48.4 ± 11.7	48.6 ± 12.4	0.93
Triglycerides (mg/dl)	149.8 ± 100.8	146.8 ± 91.8	0.75
HBA1c (%)	7.4 ± 1.7	7.4 ± 1.7	0.78
Hs-CRP (mg/l)	3.5 ± 4.7	4.8 ± 5.3	0.01
Proportion (%) with hs-CRP > 2 mg/L	46.1	53.9	0.01
Current smokers (%)	47.0	36.8	0.10
Metformin (%)	25.6	29.7	0.48
Insulin secretagogues	19.8	25.0	0.61
Insulin (%)	54.5	45.3	0.34

Anche l'analisi multivariata ci confermava il ruolo significativo sui valori di CRP del polimorfismo G(-866)A di UCP2 indipendente dai principali fattori confondenti analizzati. Veniva altresì riconfermata in questa analisi l'effetto significativo ed indipendente della adiposità addominale e del sesso sui valori di CRP (Tabella 4). Si otteneva lo stesso risultato, se nel modello si inseriva il BMI al posto della circonferenza vita.

Tabella 4: Associazione indipendente della CRP con il genotipo di UCP2 e altre variabili rilevanti

Independent variables	Dependent variable: hs-CRP		
	B	Se B	p
Age (years)	0.001	0.001	0.291
Gender (M%)	0.031	0.012	0.008
Waist circumference (cm)	0.003	0.001	0.001
HbA1c (%)	0.006	0.003	0.083
UCP2 AG-GG/GG	0.024	0.012	0.037
Centre (Naples/Turin)	-0.008	0.013	0.540

DISCUSSIONE

Lo studio dimostra che i portatori del genotipo GG di UCP2 hanno valori significativamente più elevati di infiammazione subclinica indipendentemente dall' adiposità generale ed addominale, dal controllo glicemico e dalle altre variabili analizzate. Il fatto che l' allele G riduca l' espressione dell' mRNA di UCP 2 ,con conseguente riduzione della produzione dei ROS , rende biologicamente plausibile i nostri risultati (50). L' allele G di UCP2 è stato altresì associato ad un aumento di rischio cardiovascolare in pazienti con diabete mellito tipo 2 (55) .Il nostro lavoro è il primo che dimostra che l' allele GG di UCP 2 è associato ad maggiori livelli di CRP,ed è in accordo con 2 precedenti lavori, uno condotto in una popolazione di bambini ed adolescenti sani, che dimostra che l' allele GG è associato a maggiore infiammazione subclinica (62); l'altro dimostra su 2 ampie coorti di pazienti con diabete mellito tipo 2 che l' allele GG è associato ad un aumento del rischio cardiovascolare indipendentemente da altri fattori confondenti (55). In ambo i lavori , però, la CRP non è stata

misurata. Il nostro risultato di un aumento nei soggetti con il polimorfismo GG di UCP2 della infiammazione subclinica indipendentemente da tutte le altre variabili confondenti esplorate può suggerirci uno dei possibili meccanismi che legano questo polimorfismo al rischio cardiovascolare.

STUDIO 3

Il polimorfismo Pro12Ala di PPAR Gamma 2 è associato alla nefropatia diabetica in pazienti con diabete mellito tipo 2

(Lavoro pubblicato su Diabetes Care. 2010;33(8):e114).

INTRODUZIONE

La nefropatia diabetica è una delle principali cause di insufficienza renale terminale e di dialisi. Le evidenze che la nefropatia presenti un'aggregazione familiare e una maggiore prevalenza in specifici gruppi etnici ci suggeriscono che fattori genetici hanno un importante ruolo nel rischio di sviluppo di questa complicanza (63-64). Il polimorfismo comune Pro12Ala del PPAR γ è stato studiato in relazione alla nefropatia diabetica in diversi studi con risultati discordanti ed inoltre in questi studi si è valutato come indice di nefropatia solo la microalbuminuria (41-43). Recentemente è stato pubblicato uno studio su una coorte di pazienti diabetici Cinesi che ha dimostrato che i portatori del Pro12Ala hanno un minor rischio di nefropatia diabetica definita come presenza di micro o macroalbuminuria (escrezione urinaria di albumina > 30 mg/24 ore) (65). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello prima di tutto di analizzare la relazione tra il polimorfismo Pro12Ala del PPAR γ e la nefropatia diabetica in una popolazione di pazienti con diabete mellito tipo 2 Caucasici, cioè un' etnia con una minore prevalenza di nefropatia e una maggiore frequenza di portatori del polimorfismo Pro12Ala rispetto alla popolazione Cinese. Inoltre abbiamo voluto analizzare non solo l' albuminuria, ma anche altri indici di funzione renale quali l' urea , la creatinina e il filtrato glomerulare calcolato (GFR), calcolato con la formula MDRD (Modification of Diet in renal disease) (57).

SOGGETTI

Abbiamo studiato 750 soggetti consecutivi con diabete di tipo 2, 357 donne (48%) e 393 uomini (52%), afferenti al nostro ambulatorio per lo screening delle complicanze del diabete. Criteri di inclusione erano il diabete mellito tipo 2 secondo la classificazione WHO ed un'età compresa tra 40-75 anni

RISULTATI

La frequenza dei genotipi era all'equilibrio di Hardy Weinberg; la proporzione di portatori del polimorfismo Pro12Ala era del 12.1%, simile cioè a quella osservata in altre popolazioni Caucasiche. Come si vede dalla tabella 5 i portatori del polimorfismo Pro12Ala avevano non solo una minore escrezione urinaria di albumina, ma anche valori significativamente più bassi di urea, creatinina e un GFR più elevato rispetto ai non portatori del polimorfismo; inoltre la proporzione di soggetti con una lieve insufficienza renale (i.e. creatinina ≥ 1.2 mg/dl e GFR < 60 ml/min/1.73 m²) era significativamente più bassa nei portatori del polimorfismo.

Tabella 5 : Microalbuminuria e parametri di funzionalità renale secondo il genotipo di PPAR γ

	PRO/PRO (n =660)	PRO/ALA (n=90)
Microalbuminuria ($\mu\text{g/ml}$)	72,5 \pm 256,7	40,7 \pm 78,1 *
Creatininemia (mg/dl)	0,85 \pm 0,4	0,78 \pm 0,2 *
Urea (mg/dl)	39,5 \pm 12,6	36,3 \pm 86.0 *
GFR (ml/min/1.73 m²)	94,4 \pm 22,9	97,6 \pm 22,9 *
% Soggetti con IR (GFR < 60 o creatinina > 1.2)	8,1%	2,2% *

*P<0,05

Abbiamo analizzato i possibili fattori confondenti che potessero rendere ragione di queste differenze e abbiamo mostrato che i portatori della mutazione erano perfettamente sovrapponibili ai non portatori in termini di età , durata del diabete, indici antropometrici, pressione arteriosa, compenso glicemico, lipidi plasmatici, proporzione di soggetti fumatori o in terapia con antiipertensivi o ipoglicemizzanti. Anche la CRP, marker di infiammazione subclinica, e l' HOMA, indice di insulinoresistenza , due condizioni associate sia allo sviluppo di nefropatia che al polimorfismo, non erano significativamente diverse tra portatori e non portatori del polimorfismo (Tabella 6).

Tabella 6 Caratteristiche dei partecipanti secondo il il genotipo di PPAR γ

	PRO/PRO (n=660)	PRO/ALA (n=90)
Eta'(anni)	58 \pm 8	59 \pm 7
Durata del diabete (anni)	13.4 \pm 9.3	13.1 \pm 9.2
BMI (kg/m²)	29,8 \pm 5,3	30,1 \pm 6,5
Circonferenza vita (cm)	99 \pm 12	99 \pm 13
PAS (mmHg)	153 \pm 22	158 \pm 25
PAD (mmHg)	88 \pm 12	91 \pm 13
Trigliceridi (mg/dl)	141.1 \pm 90.6	151.7 \pm 106.1
LDL (mg/dl)	117 \pm 36	116 \pm 36
Hb1Ac (%)	7,3 \pm 1,5	7,2 \pm 1,7
Terapia insulinica (%)	26	31,3
Trattamento con antipertensivi (%)	58	53,9
Fumatori (%)	41.1	45.0
HOMA	4,48 \pm 3,8	4,95 \pm 2,9
CRP(mg/L)	4,7 \pm 7,4	6,3 \pm 12

p NS per tutti i confronti

DISCUSSIONE

Il nostro studio dimostra che in una popolazione Caucasica di soggetti con diabete mellito tipo 2 la presenza del polimorfismo Pro12Ala del PPAR γ è associato ad una minore escrezione urinaria di albumina. Questo risultato appare concorde con alcuni studi pubblicati in popolazioni Caucasiche e in pazienti Cinesi, popolazione con una maggiore prevalenza della nefropatia ed una minore prevalenza di portatori della mutazione (41-43,65). Il nostro studio inoltre è il primo che dimostra che il polimorfismo Pro12Ala si associa ad una funzione renale complessivamente migliore. E' noto che la microalbuminuria e il filtrato glomerulare abbiano una importante componente genetica (63-64) . L' insulino resistenza probabilmente contribuisce allo sviluppo dell' albuminuria sia nella popolazione generale sia nei soggetti con diabete mellito tipo 2 (66,67) . Anche l'insulino-resistenza è in parte regolata dalla genetica e il Pro12Ala è stato associato con un ridotto rischio di insulino-resistenza e di diabete tipo 2 (39,40) ; quindi la sensibilità insulinica potrebbe essere un meccanismo che spiega la riduzione della microalbuminuria nei Pro12Ala ,anche se nel nostro studio non vi erano differenze dei portatori e non portatori della mutazione in termini di insulino resistenza, calcolata come HOMA index . Anche l' infiammazione subclinica , misurata nel nostro studio con la CRP, è una condizione che si può associare allo sviluppo di nefropatia, ma i valori di CRP erano sovrapponibili nei 2 gruppi. In conclusione, nel nostro studio confermiamo l' associazione del polimorfismo Pro12Ala del PPAR γ 2 con valori più bassi di microalbuminuria in un' ampia popolazione di pazienti con diabete tipo 2 Caucasiche ed espandiamo le attuali conoscenze , dimostrando che questo polimorfismo si associa, altresì, ad una funzione renale complessivamente migliore .

STUDIO 4

Albuminuria e polimorfismo Pro12Ala di PPAR γ 2 in pazienti con diabete mellito tipo 2 : una metanalisi di studi caso controllo

(Lavoro pubblicato su Nephrol Dial Transplant (2011) 0: 1–6)

INTRODUZIONE

L'associazione tra il polimorfismo Pro12Ala di PPAR γ 2 e la microalbuminuria è stata analizzata in diversi studi, ma una riduzione della microalbuminuria nei portatori del Pro12Ala non è dimostrata concordemente in tutti gli studi (41-43,65). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'associazione tra questo polimorfismo e l'albuminuria mediante una metanalisi di tutti gli studi al momento disponibili sull'argomento. Nella metanalisi sono stati, altresì, inclusi 3 nuovi studi caso- controllo condotti in Italia su pazienti con diabete mellito tipo 2.

SOGGETTI

Una revisione sistematica della letteratura è stata eseguita per trovare tutti gli studi caso – controllo condotti su pazienti con diabete mellito tipo 2 che valutassero l'associazione tra il polimorfismo Pro12Ala di PPAR γ 2 e l'albuminuria. Per la ricerca è stato utilizzato il database PubMed (National Center for Biotechnology Information). Sono state utilizzate per la ricerca le parole chiave: 'P12A', 'Pro12Ala PPAR γ ', 'polymorphism', 'microalbuminuria', 'macroalbuminuria', 'type 2 diabetes' and 'diabetic nephropathy. Sono stati individuati 6 studi (41-43,65,68,69)

Sono state, inoltre, valutate 3 nuove casistiche di soggetti con diabete mellito tipo 2. Sono stati definiti casi i soggetti con microalbuminuria (rapporto albumina /creatinina < 30

mg/mmoL e > 2.5 o 3.5 mg/mmoL rispettivamente negli uomini e nelle donne) o macroalbuminuria (rapporto albumina creatinina > 30 mg/mmoL)

I soggetti delle 3 nuove casistiche erano così suddivisi:

841 pazienti con diabete mellito tipo 2 consecutivi, reclutati presso la Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (261 casi e 580 controlli)

623 pazienti con diabete mellito tipo 2 consecutivi, reclutati all'Università di Foggia (254 casi e 369 controlli)

714 pazienti con diabete mellito tipo 2 consecutivi, reclutati all'Università di Napoli (232 casi e 482 controlli)

RISULTATI

Per quanto riguarda la distribuzione del genotipo del PPAR γ non vi era una deviazione dall'equilibrio di Hardy Weinberg in tutti i 9 studi.

Le caratteristiche dei soggetti delle 3 casistiche nuove sono descritte nella Tabella 7

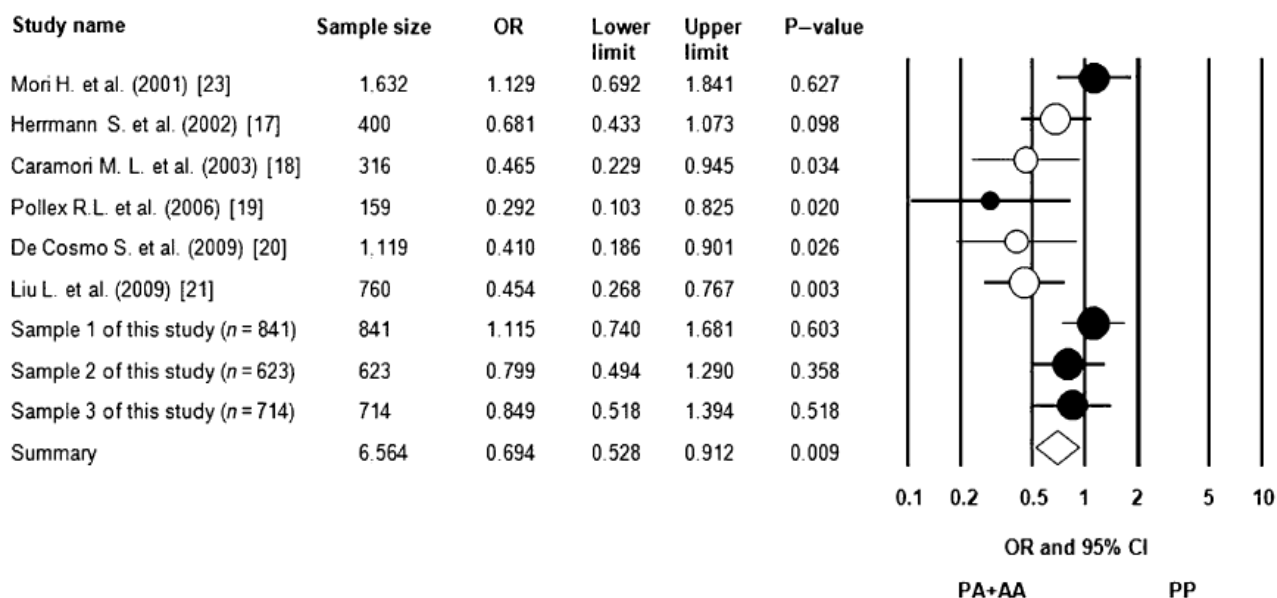
Tabella 7 :Caratteristiche dei soggetti delle 3 nuove casistiche italiane

	Sample 1 (n = 841)		Sample 2 (n = 623)		Sample 3 (n = 714)	
	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls
Sex (male/female)	162/99	264/316	131/123	170/199	147/85	225/257
Age (years)	63.2 ± 10.0	61.6 ± 9.5	63.9 ± 12.2	62.2 ± 11.5	58.7 ± 8.2	58.4 ± 7.6
Diabetes duration (years)	12.4 ± 9.2	10.5 ± 8.7	13.9 ± 9.6	12.9 ± 10.4	12.1 ± 9.5	9.2 ± 8.6
BMI (kg/m ²)	31.0 ± 5.6	30.9 ± 5.8	30.30 ± 6.5	30.6 ± 7.2	30.1 ± 5.3	29.9 ± 5.6
HbA1c (%)	9.1 ± 1.9	8.5 ± 1.9	9.6 ± 4.5	8.7 ± 2.1	7.8 ± 1.7	7.0 ± 1.4
HDL cholesterol (mg/dL)	42.9 ± 13.1	45 ± 12.5	45.3 ± 14.2	47.8 ± 14.2	48.7 ± 14.5	50.8 ± 13.8
Triglycerides (mg/dL), median (range)	145 (54-1450)	128 (37-4170)	155 (40-1685)	139 (37-711)	153 (34-743)	136 (38-598)
Hypertension n (%)	237 (91)	480 (83)	227 (89)	296 (80)	225 (97)	463 (96)
Serum creatinine (mg/dL)	1.19 ± 0.7	0.96 ± 0.3	1.06 ± 0.6	0.91 ± 0.6	0.87 ± 0.3	0.80 ± 0.3
MicroA/macroA (n)	214/47	0	192/62	0	196/36	NA
P12A genotype (PA + AA/PP)	40/221	81/499	30/224	53/316	25/207	60/422

^aData are number (n) and percentage (%) of patients and mean ± SD of clinical parameters. Cases were patients with type 2 diabetes and micro- or macroalbuminuria; controls were patients with type 2 diabetes and normoalbuminuria. Sample 1 is from the Scientific Institute Casa Sollievo della Sofferenza in San Giovanni Rotondo; Sample 2 is from the University Hospital of Foggia; Sample 3 is from the University Hospital of Naples. BMI = body mass index, HDL = high-density lipoprotein. MicroA = microalbuminuria, macroA = macroalbuminuria P12A genotype = PA + AA = heterozygotes + homozygotes for the A12 variant, PP = homozygotes for the P12 variant.

Quando venivano analizzati i 9 studi nella metanalisi l' OR overall per l' associazione tra Pro12Ala e albuminuria era 0.694 (CI 95% 0.528-0.912) (Figura 3)

Figura 3 : Metanalisi di 9 studi caso-controllo



Quindi si dimostrava che il polimorfismo Pro12Ala era protettivo per il rischio di albuminuria. Quando però venivano analizzati i risultati delle 3 nuove casistiche non veniva dimostrata associazione tra il polimorfismo e l' albuminuria.

L' analisi di metaregressione fatta includendo come covariate l'etnia, il sesso , il BMI e l' età d' esordio del diabete non spiegava la significativa ($p = 0.026$) eterogeneità dell' effetto genetico. Poiché tra gli studi vi era una discrepanza per la misurazione della albuminuria, che era stata effettuata sulle urine delle 24 ore in 4 studi, e sullo spot urinario in 3 studi, è stata effettuata una analisi di metaregressione univariata, inserendo il metodo della valutazione della microalbuminuria. Questa variabile era in grado di spiegare il 100% dell' eterogeneità con un effetto protettivo del Pro12Ala maggiore quando si utilizza il tasso della escrezione della microalbuminuria piuttosto che lo spot urinario (OR 0.529 CI 95% 0.397-0.709 $P = 0.0000164$ e OR 0.919 CI 95%0.733-1.153 rispettivamente). Dividendo i casi per micro e

macroalbuminuria il Pro12Ala si mostrava protettivo per entrambe senza effetti statistici differenti.

DISCUSSIONE

Questa metanalisi, condotta su un ampio numero di pazienti con diabete mellito tipo 2 (N 6524) dimostra che il polimorfismo Pro12Ala è protettivo nei confronti della nefropatia diabetica. Questo effetto protettivo non è dimostrato in modo omogeneo in tutti gli studi della metanalisi . La differente metodica con la quale l'albuminuria è stata misurata è in grado di spiegare l'eterogeneità dell'effetto genetico. L' effetto protettivo del polimorfismo appare maggiore quando la microalbuminuria viene valutata sulla escrezione delle urine delle 24 ore. L' effetto importante del PPAR γ sulla nefropatia diabetica è supportato dalle evidenze che farmaci agonisti del PPAR γ sono stati associati ad un miglioramento della microalbuminuria e della funzione renale (70), e dalle evidenze che il polimorfismo Pro12Ala può influenzare l' effetto di questi farmaci (43-71).

In conclusione il polimorfismo Pro12Ala è protettivo per la nefropatia diabetica, sono necessari altri studi sull'argomento al fine di incrementare sempre di più le nostre possibilità di prevenire e trattare la nefropatia diabetica.

STUDIO 5

Effetto combinato delle varianti -55C/T di UCP 3 e Pro12Ala di PPAR γ 2 sull' indice di massa corporea indipendentemente dalla dieta in una popolazione di pazienti con diabete mellito tipo 2

(Lavoro sottomesso alla rivista Diabetes/Metabolism Research and Reviews)

INTRODUZIONE

Il polimorfismo -55C/T di UCP3 è stato in diversi studi associato ad una riduzione dell' indice di massa corporea del peso corporeo, sebbene non tutti gli studi di associazione siano concordi nel confermare un BMI più basso nei portatori della variante (72-76). La possibile discrepanza degli studi di associazione tra fattori genetici e peso potrebbe essere dovuta al fatto che non si prendono in considerazione le interazioni tra fattori genetici e ambientali o tra gene e gene (56).

E' stato dimostrato che agonisti del PPAR γ sono in grado di incrementare l' mRNA dell' UCP3 a livello del tessuto adiposo (77) suggerendo che PPAR γ e UCP3 possono avere effetti sinergici. Inoltre in un nostro precedente studio, che includeva la maggior parte dei pazienti di questo studio, abbiamo dimostrato un'interazione tra il polimorfismo Pro12Ala del PPAR γ 2 e l' introito energetico giornaliero nel determinismo del peso corporeo(38) . Quindi scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'effetto del polimorfismo 55 CT dell' UCP3 sull' indice di massa corporea da solo e in combinazione con il polimorfismo Pro12Ala del PPAR γ 2; inoltre ,differentemente da molti studi di associazione , abbiamo valutato i dati sulle abitudini alimentari dei pazienti al fine di controllare i dati per dieta giornaliera.

SOGGETTI

Abbiamo studiato 343 pazienti con diabete tipo 2 (144 uomini e 199 donne), di età 40 - 70 anni, afferenti a un Distretto Sanitario della Provincia di Napoli, sottoposti ad uno screening per la valutazione delle complicanze del diabete. I criteri di esclusione sono stati :

- Trattamento con glitazonici
- Insufficienza renale (creatininemia > 2 mg/dL)
- Epatopatia (valori di ALT e/o AST superiori a 2 volte il valore massimo)
- Storia di eventi cardiovascolari nei 6 mesi precedenti lo studio
- Ipofunzione tiroidea (TSH > 4.0)
- Cancro o qualsiasi patologia, che richiede uno speciale trattamento dietetico
- Utilizzo cronico di farmaci che modificano il peso corporeo

RISULTATI

Sono stati studiati 343 pazienti con diabete tipo 2 (144 uomini e 199 donne). Come era possibile attendersi in una popolazione di pazienti con diabete tipo 2 l'età media era 63.4 ± 8.3 anni e i pazienti erano generalmente in sovrappeso con un BMI medio di $31.6 \pm \text{Kg/m}^2$. Per quanto riguarda le distribuzioni del polimorfismo di UCP3 e PPAR γ 2, la distribuzione dei genotipi era all'equilibrio di Hardy Weinberg e simile a quella osservata nelle altre popolazioni Caucasiche. Per l'UCP3 :70% omozigoti C/C, 28% C/T eterozigoti, e 2% T/T omozigoti; per PPAR γ 2 88% erano Pro/Pro, 11.7% erano Pro/Ala ed un solo paziente era Ala/Ala (0.3%); per lo scarso numero gli omozigoti per gli alleli rari sono stati analizzati con gli eterozigoti come un unico gruppo. I soggetti portatori dell'allele T dell'UCP3 avevano un BMI significativamente più basso rispetto ai non portatori (30.3 ± 6.0 VS $32.1 \pm 5.8 \text{ Kg/m}^2$ P=0.01). Per il PPAR γ 2 i portatori del genotipo Pro/Pro avevano un BMI più basso dei ProAla (31.3 ± 5.8 VS $33.6 \pm 7.1 \text{ Kg/m}^2$ P=0.02). L'effetto indipendente dei genotipi di

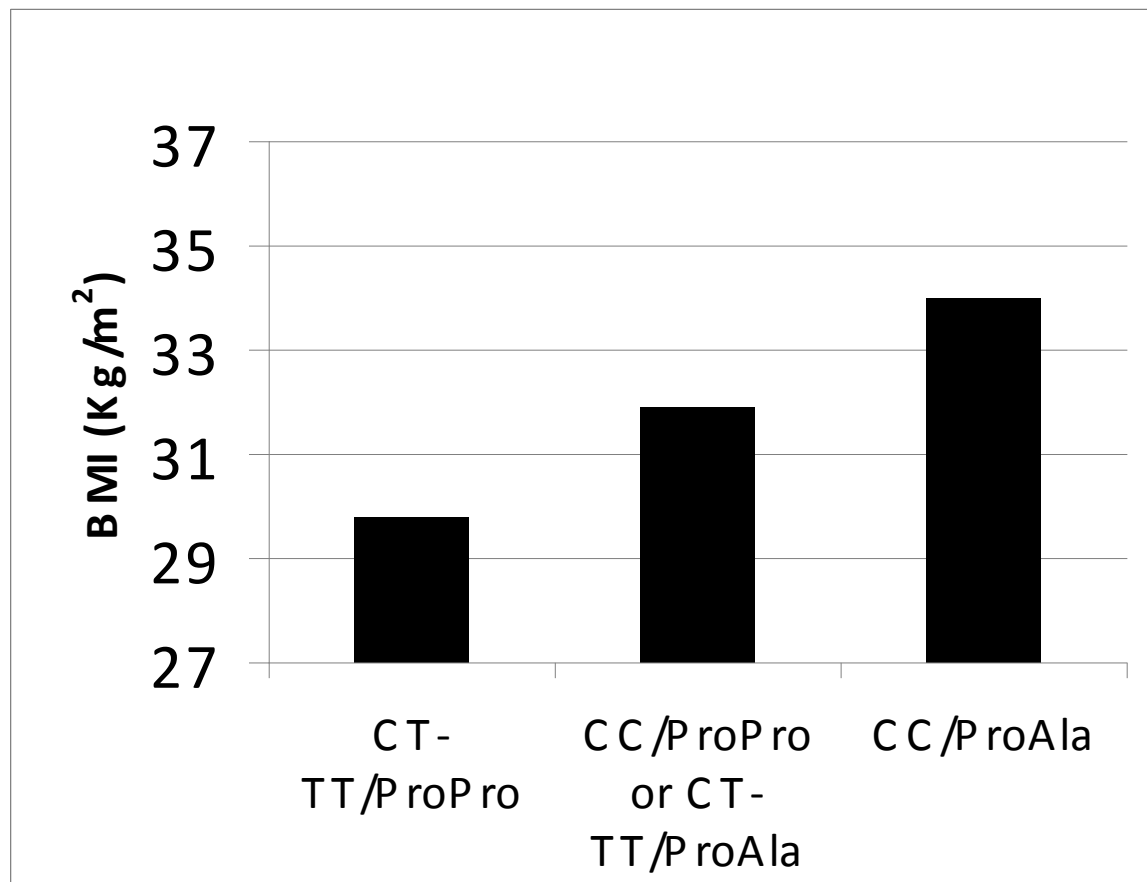
UCP3 e PPAR γ 2 sul BMI è stato analizzato mediante un' analisi di regressione multivariata. Sia il genotipo C/T-TT di UCP3 che il genotipo ProAla-AlaAla di PPAR γ 2 erano significativamente e negativamente associati con il BMI indipendentemente uno dall' altro e dalle altre variabili confondenti analizzate quali età, sesso, introito calorico giornaliero, grassi totali, grassi saturi, attività fisica, controllo glicemico e trattamento ipoglicemizzante (Tabella 8).

Tabella 8. Associazione dei genotipi e delle variabili alimentari con il BMI, analisi di regressione lineare

Variabile dipendente: BMI			
Variabili indipendenti	B	Se B	p
PPAR γ2 Pro/Pro (si /no)	-3.057	3.862	0.005
UCP3 TT-CT (si /no)	-1.753	0.132	0.020
Sesso	4.859	0.737	0.000
Età (anni)	0.09	0.042	0.834
Energia (Kcal/giorno)	0.004	0.001	0.002
Grassi totali (g/giorno)	0.040	0.076	0.601
Grassi saturi (g/giorno)	-0.272	0.177	0.126
P/S	0.076	2.420	0.975
HbA1c (%)	0.228	0.191	0.234
Metformina si/no	-0.172	0.406	0.672

Per valutare l'effetto combinato dei due genotipi sul BMI abbiamo creato tre gruppi : CT-TT/ProPro, (CC/ProPro o CT-TT/ProAla), CC/ProAla : ossia con due, uno o nessun allele protettivo. Il BMI aumentava significativamente nei tre gruppi (figura 4) con un effetto dose (i.e. 29.8 ± 5.6 , 31.9 ± 5.9 , 34.0 ± 7.1 Kg/m² $p < 0.002$ ANOVA; $p < 0.001$ per il trend lineare; $p < 0.002$, confronto post-hoc CT-TT/ProPro verso gli altri gruppi). Il BMI più basso lo avevano i partecipanti con i due alleli protettivi (CT-TT/ProPro), e il più alto quelli senza alleli protettivi CC/ProAla, la differenza tra i 2 gruppi era 4.2 Kg/m² i.e. circa 12 kg di peso corporeo (Figura 4).

Figura 4 : BMI secondo i genotipi combinati di UCP3 e PPAR γ 2



Non vi erano differenze nei tre gruppi per quanto concerneva l' introito energetico e quello dei principali macronutrienti. E' noto che i farmaci utilizzati per il diabete influenzano il peso corporeo, comunque non abbiamo osservato alcuna differenza nei regimi di trattamento utilizzati nei tre gruppi. I partecipanti allo studio erano generalmente sedentari, la proporzione di persone fisicamente attive era bassa e non differente nei 3 gruppi. I portatori dei genotipi più protettivi (CT-TT/ProPro) avevano un più alto introito calorico per kg di peso corporeo che suggeriva che questi, quando confrontati con i non portatori ,avevano una più bassa efficienza metabolica (i.e. quantità di energia consumata/kg per mantenere il peso corporeo) e perciò una minore capacità di accumulare energia come grasso (Tabella 9).

Tabella 9. Caratteristiche dei partecipanti allo studio secondo i polimorfismi di UCP3 e PPAR γ 2

	CT-TT/ProPro (n = 85)	CC/ProPro + CT-TT/ProAla (n = 233)	CC/ProAla (n = 24)	p
Sesso (%M)	40(27.8)	94(65.3)	10(6.9)	NS
Età (anni)	57.7 \pm 8.6	58.1 \pm 8.46	58.7 \pm 15.9	NS
Energia (Kcal/giorno)	1998 \pm 545	1909 \pm 533	1997 \pm 479	NS
Energia/Unità BMI	68.8 \pm 21.1	61.6 \pm 19.7	61.2 \pm 20.7	0.02
Grassi totali (g/giorno)	63.1 \pm 26.6	59.1 \pm 18.6	62.8 \pm 14.4	NS
Grassi saturi (g/giorno)	21.2 \pm 10.9	20.1 \pm 8.6	20.8 \pm 6.2	NS
P/S	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	NS
Fisicamente attivi (%)	14(18.2)	28(13.7)	5 (20.8)	NS
Metformina(%)	15(19.2%)	67(31.8%)	4(29%)	NS
HB1Ac (%)	6.9 \pm 1.8	7.6 \pm 1.8	7.4 \pm 2.05	0.015

DISCUSSIONE

In questo studio mostriamo che la risposta ponderale alla dieta può essere modulata dal background genetico. La coesistenza delle varianti CT-TT dell' UCP3 con il genotipo Pro/Pro del PPAR γ 2 è associata con un BMI significativamente più basso rispetto agli altri genotipi. A differenza di molti studi di associazione in questo studio abbiamo valutato attentamente la dieta abituale dei partecipanti, inoltre abbiamo analizzato l' effetto di fattori confondenti quali l' attività fisica, il controllo glicemico e l' utilizzo di ipoglicemizzanti. Sui meccanismi con cui i polimorfismi possono interferire con il peso corporeo possiamo fare solamente delle speculazioni. Nonostante le numerose ricerche il ruolo fisiologico delle uncoupling proteins rimane ancora da determinarsi. Oltre al noto ruolo nella termogenesi UCP3 ha un ruolo chiave nella ossidazione dei lipidi e nel frazionamento dell' energia (48,49). La mutazione 55 CT-TT è stata riportata negli Indiani Pima associarsi ad una maggiore espressione tissutale di UCP3, un maggiore metabolismo basale e un BMI più basso, per una maggiore ossidazione dei grassi (47,48). Comunque non tutti gli studi di associazione hanno invariabilmente dimostrato un effetto protettivo del polimorfismo 55 CT-TT sull' obesità (72-76). La possibile spiegazione per l'apparente discordanza rilevata è che gli studi precedenti non hanno tenuto conto dei numerosi fattori che possono interferire nell' impatto dei fattori genetici sul fenotipo come la dieta abituale, o l' interazione gene- gene. PPAR γ 2 è, insieme con l' UCP3, uno dei pochi geni per i quali l' associazione con l' obesità è stata più frequentemente riportata, inoltre è stato dimostrato che gli agonisti di PPAR γ aumentano l' espressione di UCP 3 (77). Sebbene i meccanismi con cui il PPAR γ 2 agisca sulla adipogenesi non sono chiari, risultati di studi funzionali suggeriscono che il polimorfismo Pro12Ala riduce l'insulino-resistenza, tramite l'up-regulation di molti geni adipocitari e pathways metaboliche che favoriscono la captazione da parte degli adipociti degli acidi grassi dal sangue e da altri tessuti. Una più efficiente soppressione della lipolisi da parte dell'insulina negli Ala carriers

potrebbe anche contribuire ad un maggior incremento ponderale, spostando il bilancio tra lipolisi e lipogenesi a favore della lipogenesi (78,79). La coesistenza del polimorfismo CT-TT di UCP 3 e ProPro di PPAR γ 2 possono avere un effetto sinergico nel promuovere l'ossidazione dei grassi conducendo ad un minore accumulo di grasso e ad un minore peso corporeo. Una limitazione dello studio sta nel fatto di essere condotto in pazienti diabetici obesi, e per questo motivo i risultati non sono necessariamente generalizzabili a pazienti non diabetici o con un indice di massa corporea più basso.

DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI

In questi studi presentati abbiamo dimostrato che alcuni polimorfismi genetici comuni quali il Pro12Ala di PPAR γ , -55 CT/TT di UCP3 e G(-866A) di UCP 2, in soggetti con diabete tipo 2, hanno un' associazione significativa con fenotipi clinici complessi quali l' obesità , la nefropatia diabetica e l' infiammazione subclinica indipendentemente dalle principali variabili ambientali analizzate. In particolare il Pro12Ala di PPAR γ 2 è associato ad una riduzione della escrezione urinaria di albumina ed ad una funzione renale complessivamente migliore rispetto ai non portatori della mutazione . La funzione protettiva sulla microalbuminuria è stata altresì confermata in una metanalisi effettuata su 6564 pazienti. La migliore sensibilità insulinica associata a questo polimorfismo potrebbe, da un lato, giustificare la riduzione della microalbuminuria, e dall'altra l' incremento dell' indice di massa corporea, per la maggiore tendenza da parte degli adipociti alla captazione degli acidi grassi dal sangue e da altri tessuti , come il fegato e il muscolo (78,79) .L' associazione tra questo polimorfismo e l' adiposità è tuttavia discordante in letteratura (36). La possibile spiegazione per l' apparente discordanza rilevata è che gli studi precedenti non hanno tenuto conto dei numerosi fattori che possono interferire nell' impatto dei fattori genetici sul fenotipo come la dieta abituale o l' interazione gene- gene. Noi abbiamo valutato l' effetto combinato del PPAR γ e dell' UCP 3 , due geni che possono avere un effetto sinergico, mostrando che l' utilizzo di questi due geni insieme è più informativo, per un' accurata fenotipizzazione dei pazienti, dell' utilizzo di ciascuno di essi separatamente. La combinazione dei polimorfismi di questi 2 geni è in grado di individuare soggetti (ProPro/CT-TT) che, a parità di dieta abituale, hanno un minore indice di massa corporea. Le differenze di BMI osservate, oltre ad essere statisticamente significative, sono clinicamente molto rilevanti, se pensiamo che, indipendentemente dalle calorie della dieta , i soggetti portatori dei 2 alleli protettivi pesano in media 12 kg in meno rispetto agli altri soggetti. E' noto, comunque, che il BMI non è la variabile antropometrica maggiormente

associata al rischio cardiovascolare (3,4). Misure antropometriche di adiposità centrale , come la circonferenza vita e il rapporto vita/fianchi, sono maggiormente associate al rischio di diabete, di malattie cardiovascolari e di morte (3,4) Nello studio 1 abbiamo dimostrato come, indipendentemente dal BMI, l' adiposità addominale sia associata ad una maggiore infiammazione subclinica, che può essere uno dei meccanismi che spiegano l' eccesso di rischio cardiovascolare associato all' adiposità addominale al di là dei fattori di rischio tradizionali (6). Il principale determinante della CRP, marcatore di infiammazione subclinica più comunemente utilizzato, è l' adiposità addominale, ma i suoi valori sono, altresì, per il 50% geneticamente determinati (25,26). Nello studio 2 abbiamo dimostrato per la prima volta l' associazione, significativa ed indipendente dai principali fattori ambientali, tra la CRP e il polimorfismo GG di UCP2 , gene fortemente candidato ad avere un ruolo nella infiammazione subclinica. Un limite dei nostri studi è che, essendo studi di associazione, non è possibile stabilire rapporti di causalità. Comunque in questi studi , a differenza di molti studi di associazione con polimorfismi genetici , i pazienti sono stati accuratamente caratterizzati dal punto di vista clinico e sono stati analizzati dettagliatamente i fattori legati allo stile di vita del paziente in particolare la dieta abituale, l' attività fisica, il controllo glicemico e l' utilizzo di farmaci.

In conclusione il progetto di studio affrontato rappresenta un contributo rilevante alla comprensione dei fattori genetici coinvolti nell'insorgenza della nefropatia diabetica, dell'obesità e dell' infiammazione subclinica. L'accurata caratterizzazione dei soggetti ed, in particolare la valutazione delle abitudini alimentari, rappresenta un punto di forza degli studi presentati. Il ruolo dei geni nell'eziologia dell'obesità, del diabete e delle sue complicanze dovrebbe essere esplorato ulteriormente in quanto può fornire le basi per identificare soggetti a rischio già in giovane età, permettendo di adottare delle misure preventive precoci e mirate.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cricelli C, Mazzaglia G, Samani F, Marchi M, Sabatini A, Nardi R, Ventriglia G, Caputi AP. Prevalence estimates for chronic diseases in Italy: exploring the differences between self-report and primary care database. *J Public Health Med* 25:254-257, 2003
- 2) Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 7;298(17):2028-37, 2007
- 3) Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, van der Schouw YT, Spencer E, Moons KG, Tjønneland A, Halkjaer J, Jensen MK, Stegger J, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Chajes V, Linseisen J, Kaaks R, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Bamia C, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, May AM, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Hallmans G, Weinehall L, Manjer J, Hedblad B, Lund E, Agudo A, Arriola L, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Key T, Bingham S, Khaw KT, Boffetta P, Jenab M, Ferrari P, Riboli E. : General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med.* 13;359(20):2105-20,2008
- 4) World Health Organization Western Pacific Region, International Association for the Study of Obesity and the International Obesity Task Force: The Asia-Pacific perspective: Redefining obesity and its treatment. Health Communications Australia Pty Limited: Australia; 2000
- 5) Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. : Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med.* 16;351(25):2599-610,2004
- 6) Freiberg MS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Lanier K, Wilson PW, Vasan RS: BMI vs. Waist Circumference for identifying Vascular Risk. *Obesity.* 16(2):463-9,2008

- 7) Kalupahana, N.S., Claycombe, K., Moustaid-Moussa, N.349(n_3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv. Nutr.* 2 (4), 304–316, 2011.
- 8) Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* 118 (9), 2992–3002, 2008
- 9) Olefsky, J.M., Glass, C.K.. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246,2010
- 10) Mirza S, Hossain M, Mathews C, Martinez P, Pino P, Gay JL, Rentfro A,McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: A cross-sectional study. *Cytokine* 27, 2011
- 11) Wu W, Wang M, Sun Z, Wang X, Miao J, Zheng Z. The predictive value of TNF-alpha and IL-6 and the incidence of macrovascular complications in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 21, 2010
- 12) Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS: Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(3):847-50,1998
- 13) Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS* .242:237-9, 1989
- 14) Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group.: Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 20;359(21):2195-207,2008

- 15) Festa A, D'Agostino Jr R, Tracy RP, Haffner SM; Insulin Resistance Atherosclerosis Study Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogenactivator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes : the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 51: 1131–1137, 2002
- 16) Liu S, Tinker L, Song Y, Rifai N, Bonds DE, Cook NR, Heiss G Howard BV, Hotamisligil GS, Hu FB, Kuller LH, Manson JE. A prospective study of inflammatory cytokines and diabetes mellitus in a multiethnic cohort of postmenopausal women. *Arch Intern Med* 167:1676-1685, 2007
- 17) Targher G, Bertolini L, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Increased plasma markers and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy .*Diabet Med* 19:822-826, 2002
- 18) Matsumoto K, Sera Y, Ueki Y, Inukai G, Niuro E, Miyake S. Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetic microangiopathy and macroangiopathy. *Diabet Med.* 19(10):822-6, 2002
- 19) González-Clemente JM, Mauricio D, Richart C, Broch M, Caixàs A, Megia A, Giménez-Palop O, Simón I, Martínez-Riquelme A, Giménez-Pérez G, Vendrell J. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF-alpha system in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*.63(5):525-9,2005
- 20) Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(9):3171-82,2009
- 21) Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G: C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25(10):1416-20,2001

- 22) Festa A, D'Agostino R Jr, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, Haffner SM: The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25(10):1407-15,2001
- 23) Rexrode KM, Pradhan A, Manson JE, Buring JE, Ridker PM: Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. *Ann Epidemiol.* 13(10):674-82,2003
- 24) Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF Jr, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS.: Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 116(11):1234-41,2007
- 25) Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP: Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 154:681-9, 2001
- 26) MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, Pepys MB: Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem.*50:130-4, 2004
- 27) Schulze MB, Hoffmann K, Manson JE, Willett WC, Meigs JB, Weikert C, Heidemann C, Colditz GA, Hu FB. Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr.* 82: 675–684, 2005
- 28) Qi L, Hu FB, Hu G . Genes, environment, and interactions in prevention of type 2 diabetes: a focus on physical activity and lifestyle changes. *Curr Mol Med* 8:519–532,2008
- 29) Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 20(6):501-6, 1996

- 30) Dahlman I, Arner P. Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 31(11):1629-41,2007
- 31) Lehrke M, Lazar MA .The many faces of PPARgamma. *Cell*.16;123(6):993-9,2005
- 32) Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 15;99(10):2416–22,1997
- 33) Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47(1): 98–103,1998
- 34) Cooper RS : Gene- environment interactions and the etiology of common complex disease. *Ann Intern Med* 139: 437-440,2003
- 35) Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPARgamma in humans. *Mol Genet Metab.*;83(1-2):93-102,2004
- 36) Masud S, Ye S, on behalf of the SAS group: Effect of the Peroxisome Activated Receptor g gene Pro12 Ala variant on body mass index: a meta- analysis. *J Med Genet* 40: 773-780, 2003.
- 37) Luan J, Browne PO, Harding A-H , Halsall DJ, O' Rahilly, S, Chatterjee VKK , Wareham NJ : Evidence for gene-nutrient interaction at PPARg locus. *Diabetes* 50 :686-689 , 2001.
- 38) Vaccaro O, Lapice E, Monticelli A, Giacchetti M, Castaldo I, Galasso R,Pinelli M, Donnarumma G, Rivellese AA, Cocozza S, Riccardi G. Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma2 locus modulates the relationship between energy intake and body weight in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*;30(5):1156-61,2007.

- 39) Prudente S, Ludovico O, Tassi V, Trischitta V. Heterogeneous effects of gene polymorphism on type 2 diabetes risk: lesson from the PPAR gamma 2 Pro12Ala. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 17(9):629-31,2007
- 40) Ludovico O, Pellegrini F, DI Paola R, Minenna A, Mastroianno S, Cardellini M, Marini M A, Andreozzi F, Vaccaro O, Sesti G, Trischitta V, Type 2 diabetes risk given by PPAR γ 2 Ala12 variant is heterogeneous across different populations. *Obesity* 15: 1-6,2007
- 41) Caramori ML, Canani LH, Costa LA, Gross JL. The human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 52(12):3010-3, 2003
- 42) Herrmann SM, Ringel J, Wang JG, Staessen JA, Brand E; Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes.* 51(8):2653-7, 2002
- 43) De Cosmo S, Motterlini N, Prudente S, Pellegrini F, Trevisan R, Bossi A, Remuzzi G, Trischitta V, Ruggenti P; BENEDICT Study Group. Impact of the PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism and ACE inhibitor therapy on new-onset microalbuminuria in type diabetes: evidence from BENEDICT. *Diabetes.* 58(12):2920-9, 2009
- 44) T.Z. Depieri, R.R. Pinto, J.K. Catarin and M.C. de Carli et al., UCP-3: regulation of genetic expression on skeletal muscle and possible role on body weight control. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 48 : 337-3, 2004
- 45) Schrauwen P, Xia J, Walder K, Snitker S, Ravussin E . A novel polymorphism in the proximal UCP3 promoter region: effect on skeletal muscle. UCP3 mRNA expression and obesity in male non-diabetic Pima Indians. *Int J Obes* 23: 1242-1245,1999

- 46) Walder K, Norman RA, Hanson RL, Schrauwen P, Neverova M, Jenkinson CP et al. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. *Hum Mol Genet* 7 :1431–1435,1998
- 47) Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 15: 1351-71,2007.
- 48) Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF, et al. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:1995-2003, 2007
- 49) Mattiasson G, Sullivan PG: The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal*,8:1-38, 2006
- 50) Lum H, Roebuck KA: Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*,280:C719-41,2001
- 51) Griending KK, FitzGerald GA: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108:2034-40, 2003
- 52) Fialkow L, Wang Y, Downey GP: Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 2007 ,42:153-64
- 53) Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R, Ebenbichler C, Patsch JR, Miller K, Xie M, Linnemayr V, Oberkofler H, Patsch W: A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans. *Diabetes*.51:3331-5, 2002
- 54) Yu X, Wieczorek S, Franke A, Yin H, Pierer M, Sina C, Karlsen TH, Boberg KM, Bergquist A, Kunz M, Witte T, Gross WL, Epplen JT, Alarcón-Riquelme ME, Schreiber S, Ibrahim SM: Association of UCP2 -866 G/A polymorphism with chronic inflammatory diseases. *Genes Immun.* 10:601-5, 2009
- 55) Cheurfa N, Dubois-Laforgue D, Ferrarezi DA, Reis AF, Brenner GM, Bouché C, Le Feuvre C, Fumeron F, Timsit J, Marre M, Velho G: The common -866G>A variant in the

promoter of UCP2 is associated with decreased risk of coronary artery disease in type 2 diabetic men. *Diabetes* 57:1063-8, 2008

56) Cocozza S. Methodological aspects of the assessment of gene-nutrient interactions at the population level. *NMCD* 17(2):82-8, 2007

57) Kang YS, Han KH, Han SY, Kim HK, Cha DR. Characteristics of population with normal serum creatinine impaired renal function and: the validation of a MDRD Formula in a healthy general population. *Clin Nephrol.* 63(4):258-66,2005.

58) Panico S, Dello Iacovo R, Celentano E, et al : Progetto ATENA, a study on the etiology of major chronic diseases in women: design, rationale and objectives. *Eur J Epidemiol* 8:601-608, 1992.

59) Trevisan M, Ferro-Luzzi A, Krogh V, et al.: Questionario alimentare semiquantitativo sviluppato per indagini epidemiologiche in Italia. In: Panico S. et al (eds). *La Malattia Cardiovascolare Arteriosclerotica nella Donna: Una nuova generazione di studi epidemiologici.* *Ann Ist Sup San* 28: 397- 402, 1992.

60) Salvini S: A food composition database for epidemiological studies in Italy. *Cancer Lett* 19 ;114(1-2) :299-300, 1997.

61) Saltin B, Grimby G: Physiological analysis of middle-aged men and former athletes. *Circulation* 38: 1104-1105, 1968.

62) Labayen I, Ortega FB, Sjöström M, Nilsson TK, Olsson LA, Ruiz JR. Association of common variants of UCP2 gene with low-grade inflammation in Swedish children and adolescents; the European Youth Heart Study. *Pediatr Res.*66(3):350-4,2009

63) Langefeld CD, Beck SR, Bowden DW, Rich SS, Wagenknecht LE, Freedman BI. Heritability of GFR and albuminuria in Caucasians with type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis.* 43(5):796-800,2004

- 64) Placha G, Canani LH, Warram JH, Krolewski AS. Evidence for different susceptibility genes for proteinuria and ESRD in type 2 diabetes. *Adv Chronic Kidney Dis.* 12(2):155-69,2005
- 65) Liu L, Zheng T, Wang F, Wang N, Song Y, Li M, Li L, Jiang J, Zhao W. Pro12Ala polymorphism in the PPARG gene contributes to the development of diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 33(1):144-9, 2010
- 66) Mykkänen L, Zaccaro DJ, Hales CN, Festa A, Haffner SM. The relation of proinsulin and insulin to insulin sensitivity and acute insulin response in subjects with newly diagnosed type II diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetologia.* 42(9):1060,1999
- 67) De Cosmo S, Minenna A, Ludovico O, Mastroianno S, Di Giorgio A, Pirro L, Trischitta V. Increased urinary albumin excretion, insulin resistance, and related cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes: evidence of a sex-specific association. *Diabetes Care.* 28(4):910-5,2005
- 68) Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M. The Pro12 -->Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes.* 50(4):891-4, 2001
- 69) Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, Harris SB, Hegele RA, Hanley AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* ;21(3):166-71, 2007

- 70) Yang J, Zhang D, Li J, Zhang X, Fan F, Guan Y. Role of PPARgamma in renoprotection in Type 2 diabetes: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 116(1):17-26,2009
- 71) Kang ES, Park SY, Kim HJ, Kim CS, Ahn CW, Cha BS, Lim SK, Nam CM, Lee HC. Effects of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene on rosiglitazone response in type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther*.78(2):202-8, 2005
- 72) Liu YJ, Liu PY, Long J, Lu Y, Elze L, Recker RR et al . Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families. *Physiol Genomics* 22 :197–203, 2005
- 73) Halsall DJ, Luan J, Saker P, Huxtable S, Farooqi IS, Keogh J et al. Uncoupling protein 3 genetic variants in human obesity: the C-55T promoter polymorphism is negatively correlated with body mass index in a UK Caucasian population. *Int J Obes Relat Metab Disord*.25: 472–477,2005
- 74) Damcott CM, Feingold E, Moffett SP, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF et al. Genetic variation in uncoupling protein 3 is associated with dietary intake and body composition in females. *Metabolism*.53 : 458–464 ,2004
- 75) Jun HS, Kim IK, Lee HJ, Kang JH, Kim JR, Shin HD et al. Effects of UCP2 and UCP3 variants on the manifestation of overweight in Korean children. *Obesity (Silver Spring)*.17:355-62, 2009
- 76) Hesselink MK, Mensink M, Schrauwen P .Human uncoupling protein–3 and obesity: an update. *Obes Res* 11 : 1429–144,2003
- 77) Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y, Richard D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology* 145(8):3925-34,2004

- 78) Tremblay A, Boulè N, Doucet E , Woods SC. Is the insulin resistance syndrome the price to be paid to achieve body weight stability? *International Journal of Obesity.* 29:1295-1298 ,2005
- 79) Stumvoll M, Haring H . Reduced lipolysis as possible cause for greater weight gain in subjects with the Pro12Ala polymorphism in PPAR g 2. *Diabetologia.* 45: 152-153, 2002

APPENDICE :PUBBLICAZIONI

LAVORI IN ESTENSO

- 1) **Lapice E**, Maione S, Patti L, Cipriano P, Rivellese AA, Riccardi G, Vaccaro O.
Abdominal adiposity is associated with elevated C-reactive protein independent of body mass index in healthy, non obese people. *Diabetes Care*. 2009;32:1734-6
- 2) **Lapice E**, Pinelli M, Riccardi G, Vaccaro O. Pro12Ala polymorphism in the PPAR γ gene contributes to the development of diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients: comment on the study by Liu et al. *Diabetes Care*. 2010;33:e114
- 3) **Lapice E**, Pinelli M, Pisu E, Monticelli A, Gambino R, Pagano G, Valsecchi S, Coccozza S, Riccardi G, Vaccaro O. Uncoupling protein 2 G(-866)A polymorphism: a new gene polymorphism associated with C-reactive protein in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2010 ; 28;9:68.
- 4) De Cosmo S, Prudente S, Lamacchia O, **Lapice E**, Morini E, Di Paola R, Copetti M, Ruggenenti P, Remuzzi G, Vaccaro O, Cignarelli M, Trischitta V. PPAR γ 2 P12A polymorphism and albuminuria in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of case-control studies. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 ; 0:1-6
- 5) **Emanuela Lapice**, Antonella Monticelli, Giovanna Donnarumma, Michele Pinelli, Silvia Valsecchi, Angela Giacco, Angela A Rivellese, Sergio Coccozza, Gabriele Riccardi, Olga Vaccaro. Combined effect of UCP3 and PPAR γ 2 genotype variants on BMI independent of diet in type 2 diabetic patients. Lavoro sottomesso alla rivista *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*

ABSTRACT

- 1) **E.Lapice**, A. Monticelli, G.Donnarumma, M.Pinelli, M. Giacchetti, A.Giacco, A.A. Rivellese, S.Cocozza, G.Riccardi, O.Vaccaro: Independent and combined effect of UCP3 55 C/T and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms on BMI in type 2 diabetic patients Nutr Metab Cardiovasc Dis 2008 S14
- 2) **E.Lapice**, S.Maione, L.Patti, P.Cipriano, G.Riccardi, , A.A. Rivellese O.Vaccaro: Relazione tra livelli circolanti di proteina C reattiva ,indice di massa corporea ed adiposità addominale .Il Diabete Supplemento 1 Marzo 2008
- 3) **E.Lapice**, A. Monticelli, M.Pinelli, G.Donnarumma, M. Giacchetti,S.Valsecchi, A.Giacco, A.A. Rivellese, S.Cocozza, G.Riccardi, O.Vaccaro: Effetto dei polimorfismi 55C/T di UCP3 e Pro12Ala di PPAR γ 2 sull' indice di massa corporea in pazienti con diabete tipo 2. Il Diabete Supplemento 1 Marzo 2008
- 4) **E.Lapice**, S.Maione, L.Patti, P.Cipriano, A.A. Rivellese, G.Riccardi, O.Vaccaro: Abdominal adiposity is associated with increased plasma concentration of C reactive protein independent of body weight . Diabetologia 2008 Suppl1 S846
- 5) **E. Lapice**, A. Monticelli, S. Cocozza, M. Pinelli, A.Cinaflone, G. Romano, A.A. Rivellese, S. Cocozza, G. Riccardi, O. Vaccaro. Il polimorfismo Pro12Ala di PPAR Gamma 2 è associato con indici di nefropatia in pazienti con diabete mellito tipo 2. Il Diabete Supplemento 1 Marzo 2010
- 6) **E. Lapice**, M. Pinelli, E.Pisu, A. Monticelli, R. Gambino, G. Pagano, S. Cocozza, G. Riccardi, O. Vaccaro. Il polimorfismo -866 G/A di UCP2 è associato con livelli plasmatici di proteina C reattiva in soggetti con diabete tipo 2. Il Diabete Supplemento 1 Marzo 2010