

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Specialistica

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE:
BASI MOLECOLARI DELL'AZIONE ORMONALE
Coordinatore: Prof. R. Vigneri - XXII Ciclo

Dott.ssa Maria Grazia Farina

ALTERAZIONI GENETICHE E FISIOPATOLOGICHE NELL'OBESITÀ
E NEL DIABETE TIPO 2

Tesi di Dottorato

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Lucia Frittitta

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Riccardo Vigneri

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

PARTE GENERALE.....	3
INTRODUZIONE.....	4
EPIDEMIOLOGIA DELL'OBESITA' E DEL DMT2	5
FISIOPATOLOGIA DEL DMT2	7
OBESITA' E DMT2	8
Il tessuto adiposo	9
Distribuzione del tessuto adiposo	10
Tessuto adiposo disfunzionale, infiammazione e insulino-resistenza	11
Adipochine e insulino-resistenza.....	15
Adiponectina.....	16
<i>Struttura</i>	16
<i>Funzione</i>	17
“Signaling”insulinico e resistenza insulinica	18
ENPP1	21
OBBIETTIVO GENERALE.....	24
PARTE SPERIMENTALE.....	25
STUDIO A: Ruolo del polimorfismo +276 del gene di adiponectina nell'influenzare il decremento ponderale e/o il miglioramento di parametri clinici e metabolici in pazienti con obesità grave	26
Premessa e rationale.....	26
Scopo	27
Casistica.....	28
Materiale e metodi	28
Analisi statistica.....	29

Risultati.....	30
Commento ai dati	31
STUDIO B: Ruolo del polimorfismo K121Q del gene ENPP1 nell'omeostasi glicemica	34
Premessa e razionale.....	34
Scopo	35
Casistica.....	35
Risultati.....	36
Commento ai dati	37
STUDIO C: Espressione di ENPP1 ed effetto della metformina sulla resistenza insulinica in pazienti con diabete tipo 2.	40
Premessa e razionale.....	40
Scopo	41
Casistica e disegno sperimentale	41
Metodi.....	42
Analisi Statistica	43
Risultati.....	43
Commento ai dati	44
CONCLUSIONI GENERALI	47
BIBLIOGRAFIA	48
FIGURE E TABELLE STUDIO A.....	67
FIGURE E TABELLE STUDIO B	76
TABELLE STUDIO C	84

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE

E' ormai noto che la comparsa del diabete mellito tipo 2 (DMT2) dipende dall'interazione tra le caratteristiche genetiche dell'individuo (suscettibilità genetica) e la presenza di componenti ambientali sfavorevoli (iperalimentazione e sedentarietà) in cui l'individuo vive. Anche l'obesità, principale fattore di rischio per l'insorgenza del DMT2, è una patologia complessa ad etiologia eterogenea e multifattoriale, che dipende dalla presenza di più loci (o geni) di suscettibilità, ognuno con uno specifico impatto sul fenotipo, e dal contributo di fattori ambientali [1].

Studiare e comprendere i meccanismi alla base di queste patologie multifattoriali non sono semplice sia per l'eterogeneità genetica, sia per la complessità dell'interazione genotipo-fenotipo. In altre parole, le alterazioni genetiche da sole non sono sufficienti a garantire la comparsa di un determinato fenotipo, ma è necessaria la concomitante presenza di fattori ambientali sfavorevoli; viceversa, l'esposizione a fattori ambientali sfavorevoli non è sufficiente a determinare la comparsa del fenotipo patologico in assenza di fattori genetici predisponenti. Ad esempio, è evidenza clinica comune che il diabete può insorgere anche in assenza di obesità e che non tutti gli obesi sviluppano il diabete [2, 3]. Pertanto, l'obesità è senz'altro un fattore che aumenta il rischio di DMT2, ma non è condizione necessaria e sufficiente per lo sviluppo della malattia.

Il recente aumento della prevalenza dell'obesità e del DMT2 nel mondo industrializzato è stato così rapido da rendere del tutto improbabile che sia dovuta a modificazioni del corredo genetico. A fronte di un substrato genetico che si è selezionato in millenni di scarsità di cibo, determinando la selezione positiva di genotipi che favoriscono l'accumulo di grasso, la modifica di fattori del contesto ambientale e delle abitudini di vita che ha caratterizzato gli ultimi decenni, rappresenta, di fatto, la causa principale del notevole aumento della prevalenza dell'obesità e quindi del DMT2.

EPIDEMIOLOGIA DELL'OBESITA' E DEL DMT2

La prevalenza dell'obesità è in crescente aumento, non solo nei paesi industrializzati ma anche in quelli in rapido sviluppo economico (es. India e Cina), tanto da indurre l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) a utilizzare la definizione di “pandemia”. Dati recenti, forniti dal National Center for Health Statistics degli USA, riportano che la prevalenza dell'obesità è in progressivo aumento e che circa il 68% degli americani sono obesi o in sovrappeso [4]. Una simile tendenza è presente anche in molti paesi europei, dove la prevalenza dell'obesità è aumentata progressivamente negli ultimi decenni.

Sebbene la prevalenza dell'obesità in Italia sia inferiore a quella dei paesi del Nord Europa e del Nord America, i risultati delle indagini condotte dall'ISTAT dal 2001 a oggi, mostrano un andamento in aumento, con una prevalenza in età adulta del 10% (circa 5 milioni di persone) nel 2008.

Un recente studio condotto negli USA, valutando l'andamento crescente della prevalenza dell'obesità degli ultimi 30 anni, suggerisce che se il fenomeno sovrappeso/obesità continuasse a crescere alla stessa maniera, nell'arco di 15 anni (nel 2022), circa l'80% degli americani adulti sarebbe in sovrappeso o obeso, e tale prevalenza potrebbe arrivare al 100% nell'arco dei prossimi 40 anni [5]. Anche la percentuale di adolescenti in sovrappeso si è raddoppiata negli ultimi 30 anni [6, 7]. Circa il 31.7% dei bambini e degli adolescenti americani ha un indice di massa corporea (Body Mass Index, BMI) superiore o uguale all'85° centile ed è quindi in sovrappeso o obeso [8].

Nei bambini e adolescenti italiani la prevalenza dell'obesità aumenta dal Nord al Sud, con massima prevalenza di sovrappeso e obesità in Campania (36% a fronte di una media nazionale del 24%) [9]. Anche in Sicilia si ha un'elevata prevalenza di sovrappeso e obesità nella fascia d'età tra gli 11 e i 15 anni, con una prevalenza che raggiunge il 40% a 11 anni e decresce progressivamente all'aumentare dell'età fino ai 14-15 anni, dove si registra una prevalenza sovrapponibile alla media nazionale [10]. È questa una realtà

preoccupante che prelude ad un'ulteriore diffusione dell'obesità nei prossimi anni, con peggioramento delle prospettive di vita e di salute degli italiani e che richiede pertanto urgenti provvedimenti. A tal proposito, studi recenti condotti negli USA hanno dimostrato che se il fenomeno obesità non verrà adeguatamente controllato nelle fasce più giovani, potrebbe determinarsi una riduzione dell'aspettativa di vita per le nuove generazioni di obesi rispetto a quella dei loro genitori [11]. Infatti, l'obesità che insorge in età adolescenziale ha un effetto deleterio sulla salute dell'individuo. Barker et al hanno evidenziato, in un'ampia coorte (276.835) di adolescenti danesi, che per ogni unità di incremento di BMI a partire dai 13 anni di età si registra un incremento del 15% del rischio di sviluppare malattia coronarica in età più avanzata [12].

Tale epidemia è il risultato della modifica di alcuni fattori ambientali e delle abitudini di vita (maggiore disponibilità di cibo e sedentarietà) a fronte di un substrato genetico che si è selezionato per millenni in ambiente con scarse disponibilità energetiche, quando il cibo era disponibile in modo discontinuo e il rischio di carestie era sempre presente e veniva inoltre richiesto un elevato dispendio energetico per procurarsi il cibo e per difendere le risorse alimentari. Tutto questo ha determinato la selezione positiva di un corredo genetico che favorisce l'accumulo di grasso (teoria del "genotipo risparmiatore" o "Thrifty Genotype") [13, 14]. L'abbondanza di cibo, se da un lato ha permesso lo sviluppo demografico, economico e socio-culturale delle società moderne, dall'altro rappresenta il fattore determinante nella patogenesi dell'obesità.

L'obesità rappresenta, pertanto, una bomba ad orologeria che potrebbe esplodere nei prossimi anni, incrementando l'incidenza anche del DMT2 e delle altre gravi patologie associate all'eccesso ponderale [15]. Il National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) dimostra come negli USA dal 1990 al 2000-2005 la prevalenza del DMT2 sia progressivamente aumentata passando dal 4.9% nel 1990 al 6.3% nel 2002 fino al 7.% nel 2005 (circa 20.8 milioni). Una recente metanalisi stima che oggi la prevalenza del diabete

nella popolazione americana tra i 20 e i 79 anni è del 12% (26 milioni di americani adulti) e circa 57 milioni di adulti con età >60 anni presentano il “pre-diabete” (alterata glicemia a digiuno e alterata tolleranza ai carboidrati). Si stima che nel 2030 circa 36-38 milioni di americani saranno affetti da diabete (circa il 14%) [16] e che nel 2050 saranno circa 48.3 milioni. [17, 18]. Nel mondo la prevalenza del diabete è di circa il 6.4% (285 milioni di adulti) ed è destinata a salire a 439 milioni di adulti nel 2030 [16]. Ad oggi gli Stati Uniti sono al terzo posto dopo la Cina (43.2 milioni di adulti) e l’India (50.8 milioni di adulti) per numero di persone affette da DMT2. L’obesità e il DMT2 rappresentano, pertanto, una delle principali sfide sanitarie che i paesi di tutto il mondo si troveranno ad affrontare nei prossimi decenni.

FISIOPATOLOGIA DEL DMT2

I principali fattori fisiopatologici in grado di spiegare l’insorgenza DMT2 sono rappresentati da insulino-resistenza, alterata secrezione insulinica da parte delle beta-cellule pancreatiche ed incremento della produzione epatica di glucosio. La sequenza con cui tali alterazioni fisiopatologiche si manifestano e determinano il progressivo deterioramento dell’omeostasi glicemica, non è del tutto noto [19-21].

L’insulino-resistenza, ovvero la ridotta capacità dei tessuti bersaglio (muscolo, fegato e tessuto adiposo) di rispondere alle concentrazioni fisiologiche dell’ormone, è un’alterazione comune associata all’obesità e in particolare all’obesità addominale [22]. In condizioni di insulino-resistenza, la captazione e l’utilizzazione periferica del glucosio sono ridotte. La quota di glucosio che non viene utilizzata a livello periferico resta in circolo e stimola le beta-cellule pancreatiche a produrre più insulina nel tentativo di mantenere l’omeostasi glicemica (iperinsulinemia compensatoria). Il DMT2 insorge quando le beta-cellule pancreatiche non sono più in grado di secernere la quantità d’insulina necessaria a mantenere la glicemia normale in condizioni di resistenza all’azione

biologica dell'ormone (deficit relativo di secrezione insulinica). Diversi autori, infatti, ritengono che insulino-resistenza e iperinsulinemia compensatoria rappresentano il difetto predominante in una prima fase della malattia e che la disfunzione beta-cellulare si determina in una fase più tardiva [23-25]. Altri autori suggeriscono, invece, che il difetto di secrezione insulinica è il *primum movens* della progressione al DMT2 [26-28]. Weyer et al. [29] hanno dimostrato che sia la sensibilità che la secrezione insulinica decrescono parallelamente nelle fasi precoci della malattia, durante il passaggio da NGT (Normal Glucose Tolerance) a IGT (Impaired Glucose Tolerance), mentre l'incremento della produzione epatica di glucosio, dovuto almeno in parte all'insulino-resistenza a livello epatico, determina progressivamente il passaggio da una condizione di IGT al DMT2 conclamato. Infatti, diversi studi confermano che l'aumento della produzione epatica di glucosio è presente nei soggetti diabetici ma non negli IGT [24]. Quindi l'aumento dell'output epatico di glucosio rappresenta un'alterazione più tardiva nei meccanismi di progressione verso il DMT2. I soggetti che meglio riescono a compensare i difetti relativi all'azione e/o alla secrezione insulinica saranno quelli che manterranno la condizione di NGT e che non svilupperanno mai il diabete.

OBESITA' E DMT2

L'associazione tra obesità e diabete è documentata in letteratura da diversi studi epidemiologici [30-32], come dimostrato dal fatto che circa 80-90% dei pazienti con DMT2 è in sovrappeso o francamente obeso.

L'adipocita e il tessuto adiposo giocano un ruolo importantissimo nella patogenesi dell'insulino-resistenza associata all'obesità.

Il tessuto adiposo

La cellula adiposa rappresenta l'unica cellula in cui un organello, la gocciola di lipidi, occupa più del 95% dell'intero corpo cellulare [33]. Tale organello dell'adipocita funge da contenitore dinamico per i trigliceridi che possono essere rilasciati mediante il processo della lipolisi ed accumulati attraverso il meccanismo della liposintesi. Poiché quasi tutto il volume dell'adipocita è occupato dalla gocciola lipidica, un aumento del contenuto in trigliceridi esita, di fatto, nell'aumento delle dimensioni totali della cellula. L'adipocita, infatti, è in grado di accumulare una notevole quantità di trigliceridi, come dimostrato dal fatto che le dimensioni della cellula adiposa possono variare da 25 a 200 μm di diametro [34]. Pertanto, l'adipocita è una cellula che svolge primariamente la funzione fisiologica di accumulo dell'energia sotto forma di trigliceridi.

La porzione periferica della cellula adiposa, che rappresenta il rimanente 5% della massa cellulare complessiva, una volta considerata sede di funzioni biologiche prevalentemente limitate e circoscritte allo stesso adipocita, è oggi considerata, alla luce delle nuove acquisizioni, un compartimento biologico eccezionalmente dinamico ed attivo, in grado di condizionare e regolare la fisiologia e la fisiopatologia dell'intero organismo [35]. In questa sede, infatti, sono sintetizzate e poi secrete numerose molecole di natura proteica, che sono comunemente definite "*adipochine*", in grado di esercitare azioni di tipo autocrino, paracrino ed endocrino [36]. Pertanto, il tessuto adiposo è oggi considerato un vero e proprio organo endocrino e tale funzione permette all'adipocita di regolare processi biologici a distanza in altri tessuti come il fegato, il muscolo ed il sistema nervoso centrale [37]. Le funzioni autocrina e paracrina, inoltre, consentono all'adipocita di regolare l'attività biologica propria e quella degli altri tipi cellulari adiacenti all'interno dello stesso tessuto adiposo.

Distribuzione del tessuto adiposo

A differenza di altri organi, il tessuto adiposo è variamente distribuito nell'organismo in sedi differenti: addominale (tessuto adiposo sottocutaneo superficiale e profondo), intra-addominale (tessuto adiposo viscerale-intraperitoneale e retroperitoneale) e tessuto adiposo sottocutaneo con particolare rilievo quello gluteo-femorale.

Tali depositi di tessuto adiposo presentano una differente sensibilità all'azione ormonale. Per esempio, l'adipocita del tessuto sottocutaneo è più sensibile all'insulina rispetto all'adipocita del grasso viscerale; mentre quest'ultimo mostra una maggiore sensibilità all'effetto delle catecolamine e dei glucocorticoidi rispetto al grasso sottocutaneo [38-40].

Il tessuto adiposo presente nelle varie sedi mostra differenze di espressione genica ma i markers specifici ad oggi identificati sono relativamente pochi [41]. Nonostante le differenze nell'espressione genica ad oggi accertate siano limitate, i vari depositi di tessuto adiposo presentano differenze strutturali e funzionali tali da poter essere considerati dei "mini-organismi", con specifiche competenze in rapporto ai tessuti circostanti, che si associano alle funzioni più generali che il tessuto adiposo esercita sull'intero organismo [42].

Diversi studi clinici condotti in differenti popolazioni hanno dimostrato che la quantità di grasso viscerale è associata ad insulino-resistenza, e in alcuni casi predice, la comparsa del diabete. [43], inoltre la misura della circonferenza vita rappresenta un importante criterio clinico-prognostico del rischio di complicanze legate all'obesità [44, 45].

Questa associazione è confermata anche da studi di intervento che hanno dimostrato una significativa correlazione tra perdita di peso e miglioramento del metabolismo lipidico e glucidico [46, 47].

L'obesità addominale è anche una delle maggiori cause di morbidità e mortalità. Dati della letteratura indicano chiaramente che il rapporto vita/fianchi mostra una forte relazione con l'infarto del miocardio in diversi gruppi di popolazione indipendentemente dal sesso e dall'età e tale rischio aumenta all'aumentare di tale rapporto [48].

Tessuto adiposo disfunzionale, infiammazione e insulino-resistenza

Il tessuto adiposo, oltre agli adipociti, contiene numerosi altri tipi cellulari. Queste cellule addizionali, anche se non molto visibili nelle normali sezioni istologiche, rendono conto di una porzione significativa del numero totale delle cellule che costituiscono il tessuto adiposo e sono comunemente definite “cellule stromali” [49]. Tra queste sono compresi vari tipi cellulari: preadipociti, cellule endoteliali, periciti, monociti, macrofagi, etc [50].

Le cellule stromali esercitano una serie di importanti funzioni biologiche per l'omeostasi del tessuto adiposo. Ad esempio, i periciti e le cellule endoteliali formano il tessuto vascolare, sono coinvolte nei processi di angiogenesi e contribuiscono al trofismo, allo sviluppo ed alla crescita del tessuto adiposo [51, 52]. Altri tipi cellulari, quali i monociti ed i macrofagi, intervengono nella clearance degli adipociti danneggiati da processi di necrosi o apoptosi [53]. Infine, il tessuto adiposo contiene cellule staminali pluripotenti da cui possono differenziarsi sia cellule stromali che adipociti maturi [54]. Le caratteristiche e la composizione della frazione stromale delle cellule del tessuto adiposo può variare in funzione di differenti condizioni fisiologiche e patologiche.

In condizioni fisiologiche l'insulina controlla il delicato bilancio tra l'accumulo degli acidi grassi sottoforma di trigliceridi nel periodo post-prandiale e il loro rilascio in circolo in condizioni di digiuno. La mobilizzazione dei lipidi dai depositi del tessuto adiposo determina il rilascio degli acidi grassi liberi (free fatty acids, FFA) nel torrente circolatorio che vengono poi utilizzati dai tessuti per il fabbisogno energetico e metabolico.

L'utilizzazione dei lipidi si realizza attraverso la captazione degli FFA all'interno della cellula e la loro ossidazione a livello mitocondriale (β -ossidazione). L'enzima AMP-activated protein kinase (AMPK) è un sensore dell'energia che regola il metabolismo cellulare dei lipidi e di altri substrati, che viene attivato in condizioni di deficit dei nutrienti al fine di stimolare la captazione del glucosio e la β -ossidazione lipidica per produrre energia ed inibire i processi che aumentano la spesa energetica (produzione di glucosio e sintesi lipidica), ristabilendo in tal modo l'omeostasi energetica [55]. L'AMPK controlla il metabolismo lipidico e glucidico a livello di differenti tessuti periferici (muscolo scheletrico, fegato, β -cellula, tessuto adiposo) e, a sua volta, riceve segnali ormonali con meccanismi di "feedback" che includono anche le adipochine prodotte dal tessuto adiposo [55-57]. Come detto in precedenza, il tessuto adiposo viscerale presenta elevata sensibilità per gli stimoli adrenergici (catecolamine, stress) con liberazione di elevate quantità di FFA nel circolo portale. Il tessuto adiposo è anche estremamente sensibile all'azione antilipolitica dell'insulina e risponde a concentrazioni di insulina che sono inferiori rispetto a quelle necessarie per inibire la gluconeogenesi nel fegato e l'uptake di glucosio a livello muscolare. Sia nell'obesità sia nel DMT2 c'è una marcata insulino-resistenza dell'adipocita e, venendo meno l'effetto antilipolitico, le concentrazioni di FFA nel plasma sono elevate. Freidenberg et al. [58] per primi osservarono che le cellule adipose di pazienti affetti da obesità e diabete erano resistenti all'insulina ed avevano un difetto di attivazione del recettore insulinico in risposta alla stimolazione ormonale. Questo difetto dell'attività del recettore insulinico era parzialmente recuperato dopo dimagrimento dei pazienti [59]. Recenti studi hanno dimostrato che il tessuto adiposo insulino resistente è presente in soggetti geneticamente predisposti al DMT2 (ad esempio in soggetti con storia familiare positiva per DMT2) ancora prima dell'insorgenza dell'obesità o dell'iperglicemia [60-62]. In queste fasi precoci sono presenti elevate quantità di FFA plasmatici e/o ci sono livelli di FFA plasmatici "inappropriatamente "normali" per l'iperinsuliemia

compensatoria, a causa di una inefficace soppressione post-prandiale da parte dell'insulina sulla lipolisi del tessuto adiposo.[63]. Brassard et al. hanno recentemente dimostrato che soggetti magri, in assenza di patologie associate ma con familiari affetti da DMT2, hanno una chiara alterazione del metabolismo degli FFA [64]. Questo implicherebbe una disfunzione genetica del tessuto adiposo ancora prima dell'insorgenza dell'obesità. Inoltre è stato ipotizzato che l'esposizione ad un eccesso di nutrienti durante il periodo fetale può avere delle conseguenze a lungo termine determinando infatti l'insulino-resistenza dell'organo adiposo ed obesità nell'età adulta [65].

E' stato dimostrato, in topi con basso peso alla nascita, che una veloce espansione del tessuto adiposo nel periodo post natale per eccesso di nutrienti determina nell'adipocita un'iperespressione di geni coinvolti nella lipogenesi e una ridotta espressione dei meccanismi molecolari che sono sotto il controllo del PPAR-gamma, con riduzione dei processi di proliferazione e differenziazione cellulare [66]. Il trattamento con agonisti del PPAR-gamma come i tiazolidinedioni, attivando l'espressione del PPAR-gamma, migliora la sensibilità insulinica dell'adipocita, aumentano le capacità ossidative della cellula adiposa e la secrezione di adipochine insulino sensibilizzanti quali l'adiponectina [67]. Quindi, in condizione di eccessivo intake calorico l'adipocita va in contro ad un aumento del suo volume (ipertrofia) a scapito dei processi di proliferazione e differenziazione. Tale condizione determina stress del reticolo endoplasmatico che dà origine, come meccanismo di difesa, a una risposta infiammatoria della cellula adiposa attraverso l'attivazione di una cascata di segnali quali l'attivazione di JNK (chinasi c-Jun N-terminale) fino al più importante fattore di trascrizione infiammatorio NF-kB. Inoltre, il tessuto adiposo produce diverse citochine infiammatorie (TNF-alfa, Interleuchina 1,6, MCP-1), ma anche PAI-1 e proteine della fase acuta come la PCR (proteina C reattiva) con successiva produzione dei ROS (reactive oxygen species) e apoptosi. [68]. E' stato dimostrato che l'adipocita ipertrofico attiva un profilo di espressione genica molto vicino a quello dei macrofagi

attivati (nonostante queste due cellule provengono da differenti linee cellulari) [68]. In particolare, è l'infiltrazione macrofagica che determina l'insulino-resistenza del tessuto adiposo con rilascio di FFA e deposizione ectopica di grasso negli altri tessuti, ad indicare che anche l'infiammazione è un markers di insulino-resistenza [69]. Studi recenti, infatti, hanno dimostrato che l'aumento dell'espressione di adipochine infiammatorie è proporzionale all'aumento del contenuto in macrofagi nel tessuto adiposo di pazienti obesi [70]. Tale condizione è reversibile dopo decremento ponderale [71]. Tutto ciò potrebbe contribuire a determinare oltre ai disordini metabolici sopradescritti anche aterosclerosi.

In condizioni di insulino-resistenza del tessuto adiposo, quindi, gli FFA non potendosi accumulare negli adipociti, finiscono per accumularsi nel muscolo e nel fegato causando steatosi muscolare ed epatica. Nel fegato, che è in grado di utilizzare sia il glucosio sia i grassi, l'aumentata disponibilità di un substrato limita il consumo dell'altro e viceversa. Quindi gli FFA giunti al fegato interferiscono con la fisiologica attività di clearance che la cellula epatica svolge sull'insulina, probabilmente attraverso un meccanismo di competizione a livello recettoriale o post recettoriale, con conseguente iperinsulinemia, aumento della gluconeogenesi, della sintesi di VLDL e inibizione dell'utilizzazione del glucosio. A livello muscolare si assiste a una ridotta utilizzazione del glucosio mediata dall'insulina [44] con riduzione sia della glicogenosintesi che della glicolisi e conseguente iperglicemia.

Sia l'ipertrigliceridemia (lipotossicità) che l'iperglicemia (glucotossicità) hanno effetto diretto sui tessuti periferici con alterazioni funzionali prima, e deterioramento morfologico fino alla morte cellulare (apoptosi) dopo. La beta-cellula pancreatica, ad esempio, è particolarmente suscettibile all'eccesso di FFA poiché ha una limitata capacità di immagazzinare trigliceridi. Infatti un'eccessiva esposizione agli acidi grassi causa attivazione della via NF-kB pro-infiammatoria con successiva formazione dei ROS e

apoptosi cellulare [72]. Anche l'iperglicemia causa danno e apoptosi della beta cellula sia in vivo che in vitro [73].

Adipochine e insulino-resistenza

Dunque, l'adipocita non è solo un sito di deposito di energia sotto forma di trigliceridi, ma un potente organo endocrino capace di produrre diverse citochine (leptina, TNF- α , resistina, adiponectina, ecc) in grado di modulare attivamente la sensibilità insulinica ed il metabolismo intermedio. Tali adipochine regolano numerosi processi biologici e sono in grado di agire a distanza a livello di differenti organi.

La maggior parte di queste proteine è espressa in misura abbondante a livello del tessuto adiposo, tuttavia solo un numero ristretto di esse è selettivamente prodotto dall'adipocita [74]. Infatti, mentre l'adiponectina ha espressione selettiva a livello dell'adipocita [75], altre adipochine come la leptina [76], l'adipsina [77], la resistina [78], l'omentina [79], la visfatina [80], sono prodotte anche da altri tipi cellulari. Alcune di queste adipochine, inoltre, possono, favorire la progressione dall'obesità al diabete (es. TNF- α , resistina). Come sopradetto, condizioni di stress metabolico (overfeeding) portano l'adipocita a produrre una varietà di citochine capaci di avere effetti paracrini proinfiammatori (es. MCP-1, monocytes chemoattractant protein-1, che determina il reclutamento dei macrofagi che circondano il tessuto adiposo) ed effetti endocrini su tessuti distali (TNF- α , interleuchina 1, -6 -8, resistina, MCP-1, PAI-1, visfatine, angiotensinogeno, retinolo-binding protein-4, ecc), causando insulino resistenza a livello muscolare ed epatico.

Recentemente si è avanzata l'ipotesi che anche le condizioni di ipossia possano potenzialmente indurre stress metabolico con aumento della risposta infiammatorio via NF- κ B, riduzione dell'espressione dell'adiponectina ed aumento della leptina [81].

In particolare tratterò dell'adiponectina che è stata oggetto di parte dello studio svolto durante i 4 anni di dottorato.

Adiponectina

L'adiponectina è una proteina di 30 kD identificata per la prima volta nel 1995 [75]. Successivamente altri autori hanno descritto la stessa molecola, denominandola in maniera differente: apM1 [82], AdipoQ [83] e GBP28 [84]. Il gene di adiponectina è localizzato nel braccio lungo del cromosoma 3 in posizione 27 (cromosoma 3q27). Sebbene dalla scoperta di questa adipochina siano stati pubblicati una moltitudine di lavori che ne hanno chiarito struttura, funzione e ruolo nella fisiopatologia di diverse condizioni, rimangono diversi aspetti ancora da approfondire.

Struttura

L'adiponectina è costituita da un dominio globulare carbossi-terminale e da un dominio collageneo amino-terminale ed è strutturalmente simile alla frazione 1q del complemento [85, 86].

Prima di essere secreta in circolo dall'adipocita, l'adiponectina si aggrega in complessi con differente peso molecolare [87]. La struttura molecolare di base secreta dall'adipocita è il trimero, la cui funzione biologica specifica non è ancora ben definita. Esistono, inoltre, aggregati di maggiori dimensioni che si formano grazie a legami di tipo non covalente tra 2 trimeri (esameri) e 4 o più trimeri (12-18meri), che sono definiti rispettivamente a basso peso molecolare (low molecular weight, LMW, esameri) e ad alto peso molecolare (high molecular weight, HMW, 12-18meri). Di questi complessi molecolari, soltanto l'adiponectina HMW è biologicamente attiva, mentre della LMW non si conosce ancora la funzione biologica specifica [87, 88]

L'adiponectina va incontro a profonde modificazioni post-traslazionali che includono diverse glicosilazioni [89], di cui alcune sono essenziali per l'attività biologica [90].

Inoltre, varie glicoproteine possono essere associate all'adiponectina, ma la loro rilevanza biologica non è ancora stata chiarita [91].

Funzione

Diversi studi di funzione sono stati condotti mediante l'uso di adiponectina ricombinante ottenuta dai batteri. Con questo sistema è possibile sintetizzare la forma "full length" e quella globulare (prodotta mediante clivaggio proteolitico). La somministrazione di queste due forme di adiponectina determina in vivo una riduzione dei livelli di glucosio, FFA, trigliceridi ed un aumento della captazione del glucosio e dell'ossidazione degli acidi grassi a livello muscolare [57, 92, 93]. Con maggior probabilità, l'adiponectina ricombinante ottenuta dai mammiferi rispecchia la struttura e la funzione di quella endogena. La sua somministrazione determina nel fegato la riduzione della produzione epatica di glucosio e la soppressione di geni coinvolti nella gluconeogenesi [94, 95]. A supporto di questi dati, topi in cui l'adiponectina è assente presentano una condizione di resistenza insulinica prevalentemente a livello epatico [96]. Effetti simili sono stati ottenuti in topi con iperespressione endogena di adiponectina da parte degli adipociti [97]. In topi ob/ob, determinati geneticamente per sviluppare grave obesità e capaci di accumulare patologiche quantità di grasso, l'iperespressione di adiponectina li rende insulino sensibili ed esenti dal diabete [98]. La somministrazione intracerebroventricolare di adiponectina determina una riduzione del peso e della massa grassa, per aumento della spesa energetica e non a causa di un ridotto introito di cibo [99]. A livello del miocardio, l'adiponectina esercita un potente effetto cardio-protettivo, riduce le dimensioni dell'area infartuata e accelera l'angiogenesi in modelli animali di cardiopatia ischemica [100-104].

Nell'uomo i livelli circolanti di adiponectina sono correlati alla sensibilità insulinica, al profilo lipidico e si riducono negli stati infiammatori, nell'obesità, nella sindrome metabolica e nel diabete di tipo 2 [83, 105-109]. Esistono, inoltre, importanti evidenze

sull'associazione tra bassi livelli di adiponectina circolante e malattie cardiovascolari [110, 111]. Viceversa, elevati livelli plasmatici di adiponectina riducono il rischio di infarto del miocardio [112]. Pertanto, un'eventuale terapia in grado di aumentare i livelli circolanti di adiponectina potrebbe rivelarsi di notevole beneficio nel miglioramento della sensibilità insulinica, del metabolismo lipidico e nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.

In soggetti non-obesi, con normale tolleranza ai carboidrati ma con storia familiare positiva per diabete tipo 2 c'è una evidente riduzione dell'espressione dell'adiponectina e di altri fattori insulino sensibilizzanti come il PPAR- γ . Altri autori hanno dimostrato che pazienti con familiari affetti da diabete tipo 2 hanno anche una ridotta espressione dei recettori per adiponectina AdipoR1 e AdipoR2 nel muscolo scheletrico [113].

Oltre agli effetti anti-dislipidemico ed anti-diabetogeno, l'adiponectina esercita anche un'azione anti-aterogena. Studi clinici ed epidemiologici hanno evidenziato una forte correlazione tra bassi livelli circolanti di adiponectina e fattori di rischio cardiovascolare quali l'infiammazione e la dislipidemia [112, 114-118]. Alcuni studi hanno dimostrato il suo coinvolgimento nell'inibire, in cellule endoteliali, l'attivazione di NF-kB e l'adesione di monociti [119, 120]. Inoltre, è stato dimostrato che la correlazione tra bassi livelli di adiponectina plasmatica e malattia cardiovascolare persiste anche dopo correzione per fattori di rischio come il BMI, il diabete, la dislipidemia e l'ipertensione [110, 111]. Uno studio caso-controllo condotto su un'ampia coorte ha evidenziato un ridotto rischio di infarto miocardio in soggetti con adiponectina plasmatica elevata [112]. Tuttavia le basi meccanicistiche di tali associazioni nell'uomo devono essere ancora determinate.

“Signaling”insulinico e resistenza insulinica

Il recettore per l'insulina è un recettore catalitico costituito da una struttura tetramerica che si compone di due sub-unità alfa, completamente extracellulari, contenenti il sito di legame per l'ormone, e di due sub-unità beta, caratterizzate dalla presenza di una

porzione transmembranaria e di una porzione intracitoplasmatica, capace di attività tirosino-chinasica. L'attività tirosino-chinasica è stimolata dal legame dell'insulina al suo recettore. Il legame dell'insulina alla sub-unità alfa del recettore ne determina una modificazione conformazionale e la stimolazione dell'attività tirosino-chinasica della sub-unità beta [121-123]. La chinasi attivata catalizza il trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP ad alcuni residui tirosinici presenti nella porzione intracellulare del recettore (autofosforilazione). L'autofosforilazione aumenta inoltre la capacità del recettore di fosforilare altre proteine intracellulari (eterofosforilazione) consentendo così la trasmissione del segnale dell'insulina [124, 125]. Diversi studi condotti negli anni 80 hanno dimostrato che l'attività tirosino-chinasica del recettore è indispensabile per l'azione dell'insulina. [124, 125]. Infatti, mutazioni del recettore dell'insulina che interferiscono con la capacità del recettore di autofosforilarsi determinano una riduzione della risposta biologica dell'insulina [126-129]. I substrati del recettore insulinico sono classificati come Insulin Receptor Substrates (IRS-1,IRS-2,IRS-3,IRS-4). Si tratta di proteine intracitoplasmatiche, citosoliche o legate a strutture endocellulari. Contengono diverse tirosine che, una volta fosforilate in risposta allo stimolo insulinico, sono riconosciute e legate da altre proteine. In particolare, IRS-1 fosforilato lega l'enzima PI 3-chinasi (PI3K, con dominio SH2) e lo attiva. Si tratta di un enzima dotato di 2 sub-unità. La sub-unità regolatoria (85.000 Da) si lega a tirosine fosforilate dei substrati del recettore insulinico. Il legame attiva la sub-unità catalitica (110.000 Da) che fosforila, in posizione 3, l'inositolo dei fosfoinositidi di membrana. I 3-fosfoinositidi sono riconosciuti da proteine cellulari dotate di un particolare dominio, noto come dominio PH (Pleckstrin Homology), tra cui la protein chinasi B (PKB), nota anche come AKT. Il legame con i fosfoinositidi di membrana rende AKT un miglior substrato per due enzimi normalmente dislocati sulla faccia interna della membrana cellulare, la chinasi 1 dipendente dai fosfoinositidi (PDK1) e la chinasi 2 dipendente dai fosfoinositidi (PDK2). Questi due enzimi fosforilano in

maniera sequenziale, rispettivamente, una treonina ed una serina presenti nella sequenza di AKT, attivando in questo modo l'enzima. Gli effetti noti dell'attivazione di AKT sono:

a) traslocazione del *GLUT4* (trasportatore del glucosio a livello epatico e muscolare) sulle membrane favorendo così l'utilizzazione del glucosio nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico;

b) attivazione della *glicogeno sintesi*, mediante fosforilazione e quindi inibizione della GSK3 (glicogeno sintasi chinasi 3) e quindi della glicogenolisi.

Inoltre, IRS-1 fosforilato, attiva, tramite le proteine adattatrici Grb2/SOS, le proteine Ras con conseguente attivazione delle MAP-chinasi, un insieme di proteine con attività serina e treonina chinasi, che regolano l'espressione di diversi geni coinvolti nella crescita e nella differenziazione cellulare. Tali effetti si realizzano attraverso un controllo sia trascrizionale che traduzionale. [130].

È evidente che alterazioni presenti a qualsiasi livello in questa complessa rete di segnali possono generare, o contribuire a generare, resistenza insulinica rallentando, diminuendo o bloccando la trasmissione del segnale dell'insulina. Tutti i geni che codificano per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale insulinico sono potenzialmente coinvolti nella patogenesi del DMT2 associato ad insulino-resistenza. Mutazioni genetiche del recettore dell'insulina sono responsabili di forme rare di insulino-resistenza quali il leprecaunismo e l'insulino-resistenza di tipo A [131] e, raramente, di DMT2.

Si ritiene che le alterazioni funzionali del recettore insulinico abbiano un ruolo importante nell'indurre insulino-resistenza. In particolare, negli ultimi anni sono state identificate un numero notevole di proteine che regolano, a vari livelli, l'azione biologica dell'insulina, influenzando le diverse tappe della cascata enzimatica che determina gli effetti biologici dell'insulina. La molteplicità delle proteine e delle reazioni coinvolte nella trasduzione del segnale insulinico contribuiscono a generare convergenze e/o divergenze

nella trasmissione del segnale stesso che portano alla molteplicità degli effetti dell'insulina sui tessuti e/o insulino-resistenza.

Ad esempio ci sono proteine che possono inibire l'attività tirosino-chinasica del recettore insulinico; tra queste una delle più studiate è *PTP1B*, che interagisce direttamente con il recettore insulinico defosforilando il residuo di tirosina, con conseguente inattivazione del recettore stesso. Altre proteina quali *SOCS1* (suppressor of cytokine signalling-1), *SOCS3* e *ENPP1* (ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1) interagiscono direttamente con legame allosterico con il recettore insulinico, bloccando il legame con le proteine IRS o inibendo l'attività tirosino-chinasica del recettore stesso.

Come detto in precedenza, un altro importante snodo più a valle nella cascata enzimatica della via del segnale insulinico è rappresentato da AKT/PKB che media la maggior parte degli effetti metabolici dell'azione dell'insulina. La sua attività è regolata da diverse proteine capaci di inibirne la funzione (*PP2A* e *PHLPP*) attraverso una defosforilazione diretta della proteina. Altre proteine regolatrici, come tribbles-3 (*TRIB3*) legano AKT/PKB bloccandone la sua fosforilazione ed attivazione. [132]. Tratterò, in particolare, in questa tesi ENPP1, oggetto del mio studio durante i 4 anni di dottorato.

ENPP1

ENPP-1 è una glicoproteina di membrana ubiquitaria, localizzata nella membrana plasmatica e nel reticolo endoplasmico, in grado di modulare l'attività tirosino-chinasica del recettore insulinico. Il gene che codifica tale proteina è localizzato sul cromosoma 6q22-q23, ed è formato da 25 esoni.

È stato osservato che nei fibroblasti cutanei di un paziente con grave resistenza insulinica i livelli di ENPP1 erano molto elevati [133]. Studi successivi, eseguiti sia in vitro sia in vivo, hanno dimostrato che ENPP1 inibisce l'attività tirosino-chinasica del recettore dell'insulina e che è elevata nel tessuto muscolare di pazienti obesi [134, 135]. La

misura dell'attività enzimatica di ENPP1 nei fibroblasti di pazienti con DMT2 ha documentato che i livelli di questa glicoproteina sono, in molti casi, superiori a quelli dei soggetti normali [135]. Nei fibroblasti, l'aumento di ENPP-1 si accompagna a resistenza-insulinica a livello del recettore insulinico; infatti, l'attività tirosino-chinasica del recettore insulinico risponde molto meno alla stimolazione con dosi crescenti di insulina rispetto ai fibroblasti di soggetti normali. Diversi studi effettuati negli ultimi anni nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il contenuto di ENPP1 é elevato anche nel tessuto muscolare ed adiposo di soggetti sani non diabetici non obesi con una ridotta sensibilità insulinica e che in questi soggetti l'aumentato contenuto di ENPP1 si associa con una ridotta attività tirosino-chinasica del recettore insulinico [136]. E' stato inoltre dimostrato che ENPP1 interagisce direttamente con la sub-unità alfa del recettore insulinico [137]. Tale interazione potrebbe rappresentare il meccanismo attraverso il quale ENPP-1 é in grado di inibire l'attività tirosino-chinasica del recettore insulinico.

I meccanismi che determinano un aumento del contenuto di ENPP1 nei soggetti insulino-resistenti non sono ancora noti ed è pertanto necessario verificare se l'iperespressione di ENPP-1 é un difetto secondario alle alterazioni metaboliche tipiche della resistenza insulinica (presenti anche in una fase precoce di questa condizione) oppure se é un difetto primitivo (genetico). Tra le alterazioni metaboliche, sia l'iperinsulinemia che l'iperglicemia sono buoni candidati a promuovere l'iperespressione di ENPP1, come suggeriscono le correlazioni positive tra i livelli di insulina e glicemia plasmatica con il contenuto di ENPP1 sia nel tessuto muscolare che nel tessuto adiposo di soggetti sani non obesi e non diabetici che di pazienti obesi [136, 138, 139]. Alcuni dati indicano che l'aumento della sensibilità insulinica e il miglioramento del controllo glicemico indotto dalla metformina nei pazienti diabetici é associato a una down-regulation dell'espressione di ENPP1 [140]. Nel 1999 é stato identificato un polimorfismo nell'esone 4 del gene di ENPP-1 [141]. Tale variante polimorfica é caratterizzata dalla sostituzione di una base

azotata, adenina, con una citosina in posizione 121, che determina una sostituzione aminoacidica nella proteina: glutammina (Q) al posto della lisina (K). Tale polimorfismo, pertanto, è indicato come K121Q. In un primo studio condotto su una popolazione italiana soggetti sani non-obesi, non-diabetici, portatori dell' allele Q sono affetti da resistenza insulinica rispetto ai soggetti portatori dell'allele K [141]. Inoltre, la trasfezione del cDNA della variante Q, in cellule umane in coltura, provoca una riduzione dell'attività tirosin-chinasica del recettore insulinico ed insulino-resistenza e, come dimostrato dal nostro gruppo di ricerca, l'interazione con il recettore insulinico è maggiore per ENPP1 con la variante Q rispetto a ENPP1 nativo [141, 142]. Questi dati sono stati successivamente confermati in diverse popolazioni [143, 144]. Diversi studi hanno valutato se la presenza della variante Q di ENPP1 sia associata ad insorgenza del DMT2 e, nonostante alcuni dati discordanti [145-147], una recente metanalisi condotta su 42.042 soggetti Europei ha confermato che i portatori dell'allele Q in omozigosi hanno il 40% di rischio in più di sviluppare la malattia [148].

OBBIETTIVO GENERALE

L'obiettivo generale della ricerca da me condotta in questi 4 anni di dottorato è stato quello di studiare le alterazioni genetiche e fisiopatologiche coinvolte nell'obesità e nel DMT2. Dapprima, ho focalizzato la mia attenzione sul ruolo dei polimorfismi (+276G>T e -11391G>A) del gene di adiponectina nel modulare la sensibilità insulinica e le variazioni dell'adiponectina plasmatica dopo decremento ponderale. Poi, ho concentrato il mio interesse sul polimorfismo K121Q del gene di ENPP1 e sul ruolo che tale polimorfismo esercita sull'omeostasi glicemica in un'ampia coorte di adulti e adolescenti con ampio range di BMI. In secondo luogo ho studiato, in pazienti affetti da DMT2 in trattamento con metformina, se i livelli d'espressione della proteina ENPP1 possono predire l'efficacia terapeutica del farmaco, valutata mediante la riduzione della glicemia a digiuno.

Questo obiettivo generale è stato perseguito attraverso la realizzazione di 3 differenti progetti di ricerca che per comodità di trattazione verranno presentati come:

Studio A: Ruolo del polimorfismo +276 del gene di adiponectina nell'influenzare il decremento ponderale e/o il miglioramento di parametri clinici e metabolici in pazienti con obesità grave.

Studio B: Ruolo del polimorfismo K121Q del gene ENPP1 nell'omeostasi glicemica [149].

Studio C: Espressione di *ENPP1* ed effetto della metformina sull'insulino resistenza in pazienti con diabete tipo 2 (in press).

PARTE SPERIMENTALE

STUDIO A: Ruolo del polimorfismo +276 del gene di adiponectina nell'influenzare il decremento ponderale e/o il miglioramento di parametri clinici e metabolici in pazienti con obesità grave

Premessa e razionale

L'adiponectina, adipochina prodotta dal tessuto adiposo, è in grado di esercitare numerose azioni biologiche con meccanismi di tipo autocrino, paracrino ed endocrino [35]. L'alterazione dei meccanismi di sintesi e/o secrezione di questa proteina potrebbero avere un ruolo importante nella patogenesi della resistenza insulinica, dell'obesità e del DMT2 [36].

I livelli plasmatici di adiponectina sono significativamente ridotti nei soggetti obesi [107], insulino-resistenti e nei pazienti con DMT2 [109] ed aumentano dopo decremento ponderale [150]. In uno studio condotto dal nostro gruppo di ricerca abbiamo evidenziato che l'adiponectina plasmatica correla positivamente con la sensibilità insulinica, il colesterolo HDL e negativamente con i trigliceridi. Inoltre, in un sottogruppo di pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica o palloncino intragastrico, i livelli plasmatici di adiponectina aumentavano dopo decremento ponderale e tale variazione si associava significativamente al miglioramento del profilo lipidico (colesterolo HDL e trigliceridi) [151]. Abbiamo inoltre osservato che, nonostante la stretta correlazione tra adiponectina plasmatica e sensibilità insulinica, era presente un'ampia dispersione dei valori di adiponectina, anche in soggetti con BMI simile. Anche altri lavori confermano tale osservazione [107-109] che potrebbe essere attribuita a vari fattori che influenzano la sintesi e la secrezione di adiponectina (ad esempio ormoni come i glucocorticoidi, mediatori intracellulari del TNF-alfa come il cAMP e farmaci come i tiazolidinedioni) [152, 153]. Inoltre, anche polimorfismi del gene di adiponectina potrebbero influenzare le

concentrazioni plasmatiche di adiponectina e, di conseguenza, le sue variazioni dopo decremento ponderale.

Una recente metanalisi si è occupata di analizzare l'associazione tra le variazioni genetiche del gene dell'adiponectina e i livelli plasmatici di adiponectina, l'obesità e l'insulino-resistenza [154]. Alcuni polimorfismi del gene di adiponectina si associano a variazioni della concentrazioni dell'ormone, mentre altri sono associati all'insorgenza di DMT2 [155]. L'allele A dello SNP (single nucleotide polymorphism) -11391G>A del gene di adiponectina (localizzato nella regione del promotore) associa significativamente con livelli più alti di adiponectina (Figura 1).

Dei polimorfismi del gene di adiponectina, due sono stati maggiormente studiati: +45T>G e +276T>G, rispettivamente localizzati nell'esone 2 e nel secondo introne del gene (Figura 1). Tali polimorfismi sono risultati strettamente associati con l'obesità e con l'insulino-resistenza [156]. Un aplotipo del gene di adiponectina (la combinazione tra gli SPNs +45T>G e +276T>G) è stato dimostrato essere associato con l'insulino-resistenza in soggetti non diabetici e con bassi livelli di adiponectina plasmatica. L'allele T (meno frequente) dello SNP +276G>T associa con alti livelli di adiponectina [154], ma questo dato non è supportato da dimostrazioni in vitro sul ruolo di tale polimorfismo sull'espressione del gene di adiponectina [157].

Scopo

Verificare il ruolo dei polimorfismi +276T>G e -11391G>A del gene di adiponectina nell'influenzare le variazioni dei livelli plasmatici di adiponectina e le variazioni dei parametri clinici e metabolici dopo decremento ponderale, in pazienti obesi non diabetici.

Casistica

Sono stati reclutati un numero complessivo di 190 pazienti non diabetici (criteri ADA) affetti da obesità grave ($\text{BMI } 44.5 \pm 0.5 \text{ kg/m}^2$, media $\pm$ ES; età: 34.8 ± 0.8 ; M/F 45/145) che afferivano agli ambulatori del nostro centro. Il decremento ponderale è stato indotto in tutti i pazienti, sottoposti per almeno 6-12 mesi a dieta ipocalorica (n=14), a Bendaggio Gastrico Regolabile (BGR, n=67) o a Palloncino Intragastrico (PI, n=109).

Materiale e metodi

In tutti i pazienti abbiamo valutato prima e dopo decremento ponderale (dopo 6 mesi per i pazienti sottoposti a PI e dopo 1 anno per i pazienti sottoposti a dieta e BGR): misure antropometriche (peso, altezza, BMI, circonferenza vita e fianchi), pressione arteriosa sistolica e diastolica, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, glicemia, insulinemia e adiponectina plasmatica.

I livelli plasmatici di glucosio sono stati misurati mediante la metodica della glucosio-ossidasi (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA); i livelli di insulina plasmatica sono stati analizzati mediante saggio immunoenzimatico (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), il colesterolo totale ed i trigliceridi sono stati valutati mediante metodica enzimatica (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy), la frazione HDL del colesterolo totale è stata separata con l'uso del Mg^{++} e del metodo del destrano solfato (Sclavo Diagnostics, Siena, Italy). L'adiponectina plasmatica è stata misurata mediante dosaggio radioimmunologico (Linco, St Charles, MO).

I livelli plasmatici di insulina e di glucosio sono stati misurati in tutti i soggetti prima e 30, 60, 90 e 120 minuti dopo il test di tolleranza al glucosio (75 g per os) (OGTT) ed è stato calcolato l'indice di sensibilità insulinica secondo Matsuda-DeFronzo (ISI) con la

seguinte formula: $10000/\sqrt{(\text{glicemia}_{\text{basale}} \times \text{insulinemia}_{\text{basale}} \times \text{glicemia}_{\text{media}} \times \text{insulinemia}_{\text{media}})}$ [158].

Il DNA genomico di tutti i pazienti è stato estratto da 10 ml di sangue periferico mediante l'utilizzo di un kit di estrazione (Roche, Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Il DNA è stato dosato con metodica spettrofotometrica e controllato mediante analisi elettroforetica. Gli SNPs -11391G>A e +276G>T sono stati genotipizzati mediante il saggio fluorogenico della 5'nucleasi (Discriminazione Allelica), applicato al sistema di rivelazione di sequenza dell'ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Il sistema è basato sull'impiego di due sonde TaqManMGB (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) marcate ciascuna con un diverso fluoroforo (FAM o VIC) in grado di discriminare con la massima efficienza tra l'allele nativo e l'allele mutato. Questo parte sperimentale è stata condotta c/o il laboratorio di Ricerca di Endocrinologia dell'Ospedale Garibaldi Nesima di Catania.

Analisi statistica

I dati sono espressi come media $\pm$ errore standard della media (ES), tranne nei casi in cui non venga espressamente specificato.

Le differenze tra medie e tra genotipi sono state valutate mediante il t-test di Student ed il test di analisi della varianza (ANOVA) e, ove necessario correggere i dati per altre variabili, della covarianza (ANCOVA). Le differenze nei parametri clinici e metabolici osservati prima e dopo decremento ponderale sono state testate mediante t-test di Student per dati appaiati. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software SPSS per Windows versione 11.5 ed il programma StatView 5.01.

Risultati

La percentuale dei genotipi e la frequenza allelica di entrambi gli SNPs presi in esame sono riportate in Tabella 1. I loci analizzati erano in Hardy-Weinberg equilibrium nell'intera coorte di soggetti studiati.

Nella nostra casistica, in conformità ai dati presenti in letteratura [159, 160], la frequenza genotipica per lo SNP +276G>T era 53.1% per il genotipo GG, 39.5% per la variante GT 7.4% per il genotipo TT, con una frequenza allelica del 27.0% per l'allele raro T e del 73.0% per l'allele G. Per quanto riguarda lo SNP -11391G>A, la frequenza del genotipo GG era 84.7% e 15.3% per la variante GA. Nessuno dei soggetti reclutati era portatore del genotipo AA. La frequenza allelica risultava il 7.6% per l'allele meno frequente A e il 92.4% per l'allele G (Tabella 1).

Per l'analisi dei dati, i soggetti sono stati suddivisi in 3 sottogruppi in base al genotipo +276G>T e in due sottogruppi in base al genotipo -11391G>A. Le caratteristiche generali della popolazione studiata sono presentate nella Tabella 2.

Non si riscontravano differenze statisticamente significative per i diversi parametri antropometrici e metabolici studiati alla valutazione iniziale. Dopo decremento ponderale (-18.34 ± 0.8 kg, media $\pm$ ES), diversi parametri antropometrici e metabolici (BMI, circonferenza vita e fianchi, glicemia, insulinemia, colesterolo totale, trigliceridi, ISI ed adiponectina), miglioravano significativamente ($p < 0.05-0.0001$) indipendentemente dal genotipo (Tabelle 3 e 4).

Per la variante +276G>T, nei soggetti omozigoti per l'allele T, l'aumento dei livelli plasmatici di adiponectina dopo decremento ponderale è risultato significativamente più elevato rispetto agli omozigoti per l'allele G ($+5.1 \pm 1.6$ vs $+2.1 \pm 0.4$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0.05$, anche dopo correzione per età, sesso e decremento ponderale) (Figura 2). Inoltre, anche i soggetti con genotipo GT presentavano un maggiore incremento delle concentrazioni plasmatiche

di adiponectina dopo decremento ponderale rispetto ai portatori della variante GG ($+3.4 \pm 0.5$ vs $+2.1 \pm 0.3$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$, anche dopo correzione per età, sesso e decremento ponderale) (Figura 2). Lo stesso risultato si evidenziava analizzando il modello recessivo [soggetti con genotipo TT vs. portatori dell'allele G (GT+GG)], con i portatori dell'allele T in omozigosi che mostravano un aumento medio dei valori di adiponectina plasmatica dopo dimagrimento significativamente superiore rispetto ai soggetti portatori dell'allele G (GT+GG) ($+5.1 \pm 1.5$ vs. $+2.6 \pm 0.3$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$, anche dopo correzione per età, sesso e decremento ponderale) (Figura 4A).

Per quanto riguarda l'ISI, è stato riscontrato un significativo miglioramento dopo decremento ponderale nei i soggetti omozigoti per l'allele T rispetto ai GG e GT ($+6.4 \pm 2.1$ vs $+2.9 \pm 0.4$ e $+3.0 \pm 0.5$; rispettivamente, $p < 0.01$, dati corretti per età, sesso e decremento ponderale) (Figura 3). Allo stesso modo, analizzando il modello recessivo i portatori dell'allele T in omozigosi mostravano un maggiore e significativo incremento dei valori di ISI rispetto ai soggetti portatori dell'allele G (GT+GG) ($+6.4 \pm 2.1$ vs. $+2.9 \pm 0.3$, $p < 0.01$, anche dopo correzione per età, sesso e decremento ponderale) (Figura 4B).

Come atteso, anche per lo SNP -11391G>A, nei soggetti portatori dello stesso genotipo diversi parametri clinici e metabolici miglioravano significativamente dopo decremento ponderale. (Tabella 4) Tuttavia, contrariamente allo SNP +276G>T, non c'erano differenze significative tra i due genotipi (GG vs. GA) per quanto riguarda le variazioni dell'adiponectinemia e dell'ISI dopo decremento ponderale.

Commento ai dati

Dati della letteratura hanno evidenziato che l'incremento di adiponectina dopo decremento ponderale è significativamente associato con il miglioramento della sensibilità insulinica, suggerendo che tale adipochina potrebbe giocare un ruolo importante nei meccanismi che determinano il miglioramento dei parametri metabolici dopo decremento

ponderale [161, 162]. I risultati del nostro studio dimostrano che dopo decremento ponderale, come atteso, aumenta l'adiponectina, migliora la sensibilità insulinica e migliorano diversi parametri metabolici.

E' riportato in letteratura che le varianti -11391G>A e +276G>T del gene di adiponectina si associano a livelli circolanti dell'ormone più elevati, probabilmente attraverso un'alterazione dell'espressione genica e quindi dei livelli plasmatici di adiponectina [163]. A differenza di alcuni dati presenti in letteratura, nella nostra casistica in condizioni basali, le varianti -11391G>A e +276G>T non si associano a differenti concentrazioni di adiponectina. Questo potrebbe essere dovuto all'esiguità del campione o al fatto che altri polimorfismi e/o altri geni possono essere coinvolti nella regolazione dei livelli plasmatici di adiponectina. Inoltre, è necessario precisare che la maggior parte degli studi sull'associazione di tali SNPs ed i livelli plasmatici di adiponectina sono stati effettuati su soggetti di differente etnia (prevalentemente asiatici) e con parametri antropometrici differenti rispetto a quelli della nostra casistica, costituita esclusivamente da soggetti obesi.

Dopo decremento ponderale, i livelli di adiponectina nei soggetti omozigoti per l'allele T aumentano di quasi il 50% rispetto al valore di base, raggiungendo valori sovrapponibili a quelli riportati nei soggetti normopeso. Lo stesso risultato viene evidenziato per le variazioni dell'indice ISI dopo dimagrimento, per il quale abbiamo osservato un aumento pari a più del doppio rispetto al valore basale. Questi dati sono in contrasto con quelli pubblicati da Shinet et al. [159], che riporta un maggiore incremento dei livelli plasmatici di adiponectina dopo decremento ponderale nei soggetti portatori dell'allele G in omozigosi rispetto ai portatori dell'allele T. È necessario tuttavia precisare che in questo studio i pazienti con genotipo GG, rispetto ai GT e TT, presentavano valori di adiponectina più bassi già di base, prima del decremento ponderale e quindi con una maggiore probabilità di ottenere un miglioramento delle concentrazioni plasmatiche

dell'ormone dopo decremento ponderale; infatti, un altro studio dimostra che i bassi valori di adiponectinemia sono predittivi di un maggiore incremento dei livelli plasmatici dell'ormone dopo decremento ponderale [164].

In conclusione, i nostri dati indicano che il polimorfismo +276G>T del gene di adiponectina potrebbe essere coinvolto nei meccanismi che determinano il miglioramento della sensibilità insulinica e l'aumento dei livelli di adiponectina dopo dimagrimento. Ciò tuttavia non esclude la possibilità, nell'ambito di una malattia multifattoriale e poligenica come l'obesità, che altri meccanismi molecolari e/o altri geni possano giocare un ruolo importante nel determinare le variazioni endocrino-metaboliche indotte dal decremento ponderale.

STUDIO B: Ruolo del polimorfismo K121Q del gene ENPP1 nell'omeostasi glicemica

Premessa e razionale

ENPP-1 è una glicoproteina di membrana ubiquitaria localizzata nella membrana plasmatica e nel reticolo endoplasmico, in grado di modulare l'attività tirosino-chinasica del recettore insulinico. (Figura 5). Il gene che codifica tale proteina è localizzato sul cromosoma 6q22-q23, ed è formato da 25 esoni. (Figura 6)

Diverse evidenze dimostrano che la glicoproteina di membrana ENPP1 svolge un'azione inibitoria sul recettore insulinico con conseguente insulino resistenza:

- a) i livelli di espressione ENPP1 sono aumentati in cellule muscolari, adipociti e fibroblasti di pazienti con insulino resistenza;
- b) l'iperespressione di ENPP1 in colture cellulari determina una ridotta risposta al segnale insulinico;
- c) animali transgenici che iperesprimono ENPP1 in diversi tessuti sono diabetici e/o insulino-resistenti;
- d) un polimorfismo del gene di ENPP1 (K121Q) aumenta l'effetto inibitorio di tale proteina sul recettore insulinico e associa con insulino resistenza.

In un recente studio condotto su 2.511 partecipanti al Framingham Heart Study, la variante Q121 del gene di ENPP1 associava ad iperglicemia ed insulino resistenza. Inoltre, da una recente ed ampia metanalisi è emerso che soggetti di origine europea, omozigoti per l'allele Q121 (genotipo QQ) hanno un rischio di diventare diabetici aumentato del 38% [148].

Scopo

Scopo del nostro studio è stato studiare il ruolo del polimorfismo K121Q del gene *ENPP1* nell'omeostasi glicemica in soggetti adulti e adolescenti di origine caucasica.

Casistica

Due campioni di soggetti di razza caucasica, senza legami di parentela, provenienti dalla Sicilia orientale, con valori di glicemia a digiuno <7.0 mmol/l (126 mg/dl):

764 adulti (289 non obesi, M/F: 138/151, età 36.7 ± 0.7 ; 475 obesi, M/F: 127/348, età 37.2 ± 0.5);

240 bambini ed adolescenti obesi (M/F: 91/149, età 8-17 anni; BMI z-score 2.27 ± 0.04).

In tutti i soggetti abbiamo valutato:

Parametri antropometrici e biochimici analizzati: peso, altezza, BMI, assetto lipidico, curva da carico orale di glucosio (OGTT).

Parametri metabolici derivati dall'OGTT: indice insulinogenico (IGI), espressione della prima fase della secrezione insulinica; indice di sensibilità insulinica (ISI, Matsuda-DeFronzo); disposition index (DI = IGI x ISI), espressione del rapporto esistente tra secrezione e sensibilità insulinica.

Analisi genetica: eseguita mediante RFLP (restriction fragment-length polymorphism), con una percentuale di errore $<1\%$. Le varianti del polimorfismo K121Q erano in Hardy-Weinberg equilibrium in entrambi i campioni studiati.

Analisi Statistica: i dati sono presentati come media $\pm$ errore standard. Tutte le analisi sono state corrette per età, sesso e BMI. Le differenze tra i gruppi per variabili continue sono state analizzate mediante il test ANOVA ad una via. Il test ANOVA per misure ripetute è stato utilizzato per valutare le differenze dei valori di glicemia ed

insulinemia durante OGTT tra i soggetti con differente genotipo. Il test di regressione semplice è stato utilizzato per analizzare la correlazione tra variabili continue.

Risultati

Le caratteristiche cliniche dei soggetti suddivisi in base al genotipo K121Q di ENPP1 sono presentate nella Tabella 5. La glicemia a digiuno si associava con la variante Q121, essendo più elevata nei soggetti QQ rispetto ai KK ($p<0.05$). Sia nei soggetti obesi che in quelli non obesi il profilo glicemico durante OGTT peggiorava progressivamente passando dal genotipo KK, al KQ e QQ. Per tale ragione, obesi e non obesi sono stati considerati come unico gruppo e stratificati secondo il genotipo. In dettaglio, i soggetti QQ presentavano glicemie significativamente più elevate sia rispetto ai soggetti KK che KQ ($p<0.05$); inoltre, le glicemie dei soggetti KQ erano significativamente più elevate rispetto a quelle dei portatori del genotipo KK ($p<0.05$) (Figura 7A). Tali differenze non erano significative per il profilo insulinemico durante OGTT, ad eccezione dei livelli di insulinemia a 30 minuti, che nei soggetti QQ erano significativamente più bassi dei soggetti KQ e KK ($p<0.0001$) (Figura 7B). Anche la prima fase di secrezione insulinica (come mostrato dall'indice insulinogenico, IGI) era differente a seconda del genotipo. Infatti, l'IGI era significativamente ($p<0.0001$) ridotto nei QQ rispetto ai soggetti KK e KQ (Figura 8A). Anche per l'indice di sensibilità insulinica (ISI) venivano riscontrate differenze statisticamente significative tra i genotipi. In particolare, all'analisi post-hoc, l'ISI era significativamente ($p<0.05$) ridotto nei soggetti KQ, ma non nei soggetti QQ, rispetto ai soggetti KK (Figura 8B). Infine, anche il disposition index (DI) era significativamente differente nei diversi genotipi. In particolare, i soggetti KQ e QQ presentavano un DI significativamente ($p<0.05$ e $p<0.001$, rispettivamente) più basso dei soggetti KK; inoltre, il DI dei soggetti QQ era significativamente ($p<0.01$) più basso dei soggetti KQ (Figura 8C).

La correlazione tra BMI ed ISI era significativamente maggiore nei soggetti QQ ($R^2=0.54$) rispetto ai soggetti KK ($R^2=0.44$), o KQ ($R^2=0.45$), dopo correzione dei dati per età e sesso (p di interazione genotipo-BMI <0.001 ; Figura 9) ad indicare un'interazione genotipo-BMI nel modulare la sensibilità insulinica. Tutte le suddette alterazioni (iperglicemia, riduzione della prima fase della secrezione insulinica e riduzione del DI) sono state replicate anche nella popolazione di adolescenti sovrappeso o obesi. Infatti, i ragazzini con genotipo KQ presentavano valori plasmatici di insulinemia a digiuno più elevati rispetto ai soggetti KK (Tabella 5). Inoltre, anche il profilo glicemico durante OGTT tendeva ad essere peggiore nei soggetti QQ rispetto ai soggetti KK e KQ, anche se tale differenza non raggiungeva la significatività statistica ($p=0.2$, Figura 10A). All'analisi post-hoc i valori di insulinemia durante OGTT risultavano significativamente ($p<0.01$) più elevati nei soggetti KQ rispetto ai soggetti KK (Figura 10B). Le differenze di IGI, ISI e DI tra i diversi genotipi in questo gruppo di pazienti erano sovrapponibili a quelle riscontrate nella popolazione adulta. In particolare, i soggetti QQ avevano, rispetto ai soggetti KQ e KK, un IGI ($p<0.001$ e $p<0.05$, rispettivamente) significativamente più basso (Figura 11A). Inoltre, l'ISI era significativamente ($p<0.01$) ridotto nei soggetti KQ, ma non nei soggetti QQ, rispetto ai soggetti KK (Figura 11B). Infine, i soggetti QQ presentavano, rispetto ai soggetti KQ e KK, un DI significativamente più basso ($p<0.05$ e $p<0.01$, rispettivamente, Figura 11C).

Commento ai dati

I risultati di questo studio dimostrano che soggetti adulti, portatori della variante Q121 del gene ENPP1 hanno un'alterazione dell'omeostasi glicemica durante OGTT causata da un'alterata interazione tra sensibilità e secrezione insulinica. I soggetti iperglicemici potrebbero avere sia una ridotta secrezione insulinica ma anche una ridotta sensibilità insulinica. Infatti i soggetti QQ presentano un'alterazione della prima fase di secrezione

insulinica che si traduce nella riduzione del DI. Di contro, i soggetti KQ che hanno una prima fase di secrezione insulinica normale, ma una ridotta sensibilità insulinica hanno anch'essi una riduzione del DI. L'ISI non è ridotto nei soggetti con genotipo QQ, probabilmente a causa dei bassi valori di insulinemia riscontrati nei primi 60 minuti dell'OGTT, che sono invece espressione della ridotta secrezione insulinica.

Inoltre, abbiamo osservato che esiste una interazione significativa tra genotipo K121Q e BMI nel modulare la sensibilità insulinica. Questo dato è in linea con i dati della letteratura che riportano come tale interazione possa condizionare l'insorgenza del DMT2 e delle complicanze cardiovascolari [165, 166]. Questi dati sembrano suggerire, pertanto, che i soggetti QQ tendono ad avere una ridotta sensibilità insulinica specie se sono anche obesi. Nei soggetti magri, pertanto, l'effetto negativo del genotipo QQ sulla sensibilità insulinica sembra essere minore e, da solo, il difetto di secrezione insulinica non è sufficiente per determinare l'insorgenza del DMT2 [167]. Di contro, nei soggetti obesi l'effetto negativo della variante Q121 sulla secrezione insulinica si somma all'effetto dell'interazione BMI/genotipo sulla sensibilità insulinica, incrementando il rischio di DMT2.

Un'altra importante conclusione del nostro studio è che tali alterazioni dell'omeostasi glicemica sono state riscontrate anche in adolescenti obesi portatori del genotipo QQ, ad indicare che già nelle fasi precoci della vita esiste in questi soggetti un'alterazione della sensibilità e della secrezione insulinica.

Lo studio genetico delle malattie multifattoriali può essere condizionato da risultati falsamente positivi. Tuttavia i valori di "p" altamente significativi e l'omogeneità dei risultati, con la replicazione dei dati in una popolazione di adolescenti con sovrappeso/obesità, rende poco probabile la possibilità di risultati falsamente positivi.

Inoltre, i nostri dati concordano con la recente evidenza dell'associazione del genotipo QQ con il DMT2 in un'ampia meta-analisi effettuata su soggetti di etnia caucasica [148].

In conclusione, la riduzione della prima fase della secrezione insulinica e l'alterato rapporto tra la secrezione e la sensibilità insulinica sono le principali alterazioni associate a tale polimorfismo e, probabilmente, spiegano l'aumento del rischio di sviluppare il DMT2 in questi soggetti.

STUDIO C: Espressione di ENPP1 ed effetto della metformina sulla resistenza insulinica in pazienti con diabete tipo 2.

Premessa e razionale

La metformina, biguanide utilizzata come farmaco di prima scelta nel trattamento di pazienti con DMT2 soggetti con DMT2 in sovrappeso o obesi [168], è un farmaco insulino-sensibilizzante, il cui meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiaro. La metformina riduce la produzione epatica di glucosio [169, 170], aumenta il trasporto di glucosio e la sua utilizzazione a livello muscolare, incrementando altresì la glicogeno-sintesi, sia in soggetti diabetici [171, 172] che non diabetici [173], ed è anche in grado di migliorare il profilo lipidico [169]. Inoltre la metformina sembra essere coinvolta anche nell'attivazione dell'AMPK, che up-regola l'espressione di IRS-1 attraverso l'inibizione della via mTOR [174-176]

ENPP1, come detto in precedenza, è una glicoproteina di membrana coinvolta nella patogenesi dell'insulino-resistenza. La sua iperespressione al livello dei tessuti bersaglio dell'insulina o la variante Q del polimorfismo K121Q del gene ENPP1, sono caratterizzate da un maggiore effetto inibitorio sull'attivazione del recettore insulinico [142, 177]. Diversi dati della letteratura hanno confermato che la variante Q del gene ENPP1 si associa ad insulino resistenza [141, 149, 165] e DMT2 [143, 147]. Nello studio "Diabetes Prevention Program", l'effetto della metformina nel ridurre il rischio di sviluppare il DMT2 si è rivelato maggiore nei portatori della variante Q, rispetto agli omozigoti KK, suggerendo che il genotipo K121Q di ENPP1 possa predire l'efficacia terapeutica del trattamento con farmaci insulino-sensibilizzanti [178].

Dati preliminari indicano che l'aumento della sensibilità insulinica ed il miglioramento del controllo glicemico indotto dalla metformina nei pazienti diabetici è associato ad una down-regulation dell'espressione di ENPP1 [140]. Inoltre, altri studi riportano che la variante Q121 del gene di ENPP1 predice l'effetto positivo dello stile di vita sull'omeostasi glicemica e sulla sensibilità insulinica [179, 180]. Ad oggi, tuttavia, non sono disponibili dati sul ruolo dei livelli di espressione di ENPP1 nel modulare l'effetto di terapie farmacologiche insulino sensibilizzanti quali il trattamento con metformina.

Scopo

Lo scopo del nostro studio è stato di verificare se i livelli di espressione di ENPP1, misurati nei linfociti umani, sono in grado di predire l'efficacia della metformina sull'omeostasi glicemica in pazienti con DMT2.

Casistica e disegno sperimentale

Questo protocollo di studio, avviato in collaborazione con l'Unità di Endocrinologia dell'Istituto Scientifico "Casa Sollievo della Sofferenza" di San Giovanni Rotondo e con l'Istituto "Casa Sollievo Sofferenza - Mendel" di Roma (Prof. V. Trischitta), è stato finanziato nel 2007 con un grant della Società Italiana di Diabetologia (SID, Prof V. Trischitta).

Sono stati reclutati 62 pazienti con DMT2 (36 maschi e 26 femmine) che afferivano consecutivamente al centro Antidiabetico dell'Ospedale Garbali di Catania (n=34) e al Reparto di Endocrinologia dell'Istituto Scientifico Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (n=28), con i seguenti criteri di inclusione:

- età compresa tra 40-70 anni;
- durata del diabete compresa tra 2 e 20 anni;

- HbA1c tra 6.5 e 9%;
- assenza di terapia insulinica.

Criteri di esclusione: controindicazioni al trattamento con metformina

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a un periodo di 5 giorni di wash-out dalla terapia con ipoglicemizzanti orali precedentemente praticata e, successivamente, sono stati trattati per un periodo di 3 mesi con 2550 mg/die di metformina. La terapia antipertensiva e antidislipidemica eventualmente praticata e la dieta non subivano modifiche e i pazienti venivano invitati a non modificare lo stile di vita durante il periodo di trattamento.

Metodi

In tutti i soggetti sono stati valutati, prima e dopo 3 mesi di trattamento con metformina: parametri antropometrici (peso, altezza, BMI, circonferenza vita), HbA1c, glicemia, insulinemia, trigliceridi, colesterolo HDL. Anche i livelli di espressione dell'mRNA di ENPP1, sono stati misurati prima e dopo 3 mesi di terapia mediante PCR quantitativa, real time, su linfomonociti da sangue periferico. Tutti i parametri glicometabolici sono stati misurati presso il laboratorio del nostro presidio ospedaliero. L'HbA1c è stata misurata mediante metodica HPLC. La resistenza insulinica è stata valutata mediante indice HOMA calcolato con la seguente formula: $\text{insulinemia (mU/l)} \times \text{glicemia (mmol/l)} / 22.5$.

La misura dei livelli di mRNA dei linfo-monociti circolanti è stata valutata presso l'istituto "CSS-Mendel" di Roma dalla Dott.ssa S. Prudente.

I pazienti venivano considerati affetti da ipertensione se presentavano valori di pressione sistolica ≥ 130 mmHg e diastolica ≥ 85 mmHg o se praticavano terapia antipertensiva; mentre venivano classificati come dislipidemicici se praticavano terapia

antidislipidemica o avevano il colesterolo totale ≥ 220 mg/dl, HDL-colesterolo ≤ 40 mg/dl negli uomini e ≤ 50 mg/dl nelle donne e i trigliceridi ≥ 150 mg/dl.

Analisi Statistica

I valori dei parametri clinico-metabolici dei pazienti studiati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard (DS), mentre le frequenze di distribuzione delle variabili categoriche sono espresse in percentuali. I livelli di espressione di ENPP1 sono stati trasformati in logaritmi a causa della distribuzione non parametrica. Le differenze tra i valori prima e dopo terapia con metformina sono state confrontate con il test t di Student per dati appaiati. Le variabili predittive delle variazioni della glicemia dopo trattamento con metformina sono state analizzate mediante modelli di regressione lineare univariata e la multivariata. Il test del rapporto di verosimiglianza è stato utilizzato per paragonare l'adattamento di due modelli: con e senza ENPP1. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SAS (versione 9.1, SAS Institute, Cary, NC).

Risultati

Le caratteristiche dei pazienti studiati sono mostrate nella Tabella 6.

Dopo 3 mesi di trattamento con metformina, i seguenti parametri miglioravano significativamente: BMI ($p < 0.001$), glicemia ($p < 0.001$), colesterolo HDL ($p < 0.001$) e $HOMA_{IR}$ (3.8 ± 2.0 vs. 3.0 ± 2.0 , $p < 0.001$) (Tabella 7). Anche i trigliceridi si riducevano, ma tale variazione non raggiungeva la significatività statistica.

I livelli medi di mRNA di ENPP1 non erano significativamente differenti prima e dopo terapia con metformina (6.8 ± 5.8 vs. 7.4 ± 5.5 UA, $p = 0.20$).

I livelli di mRNA di ENPP1 di base (prima dell'inizio del trattamento con metformina) correlavano significativamente con l'efficacia del trattamento con metformina, come indicato dalle variazioni della glicemia (valore basale meno valore dopo 3 mesi di trattamento; $p=0.03$, $R^2=0.07$) (Tabella 8). L'efficacia della terapia con metformina veniva inoltre predetta dal genere (maggiore efficacia nel sesso femminile rispetto a quello maschile) e dai più elevati livelli di glicemia a digiuno; la durata della malattia, il BMI e l'HOMA-IR non erano invece predittivi di efficacia della terapia. La correlazione tra i livelli basali di mRNA di ENPP1 e le variazioni della glicemia dopo terapia con metformina era statisticamente significativa nelle femmine ($n=26$, $p=0.002$, $R^2=0.34$), ma non raggiungeva la significatività statistica nei maschi ($n=36$, $p=0.87$, $R^2=0.001$), suggerendo una possibile interazione tra genere ed espressione di ENPP1 nel modulare l'azione della metformina (Tabella 8). Applicando il modello statistico di analisi multivariata che comprendeva anche la durata del diabete e il BMI, solo il genere ($p=0.003$), la glicemia a digiuno ($p<0.001$) ed i livelli basali di mRNA ($p=0.04$) risultavano predittori indipendenti dell'efficacia della metformina (ovvero delle variazioni della glicemia dopo trattamento con metformina). Sono stati inoltre testati 2 differenti modelli di analisi multivariata: con e senza i livelli di mRNA di ENPP1. L' R^2 della multivariata dei due modelli statistici era pari a 0.46 aggiungendo i livelli di mRNA di ENPP1 e 0.41 senza i livelli di mRNA di ENPP1. La differenza tra i due modelli risultava statisticamente significativa ($p<0.002$, test del rapporto di verosimiglianza tra i due modelli).

Commento ai dati

Come atteso, la terapia con metformina migliora la resistenza insulinica in pazienti con DMT2. I nostri dati indicano per la prima volta che l'espressione di ENPP1 è predittore in maniera indipendente dell'efficacia ipoglicemizzante della metformina nei

pazienti con DMT2. Inoltre, aggiungendo nel modello di analisi multivariata i livelli di espressione di ENPP1 alle variabili cliniche studiate, la predittività dell'efficacia della metformina migliorava significativamente del 5% (R^2 da 0.41 a 0.46, $p=0.002$).

La misura dell'espressione di ENPP1 (ottenibile da un semplice dosaggio di laboratorio) potrebbe essere utile per individuare un particolare fenotipo di soggetti (es: le donne, come riportato dai nostri dati) per i quali è possibile individualizzare la terapia con metformina. I risultati di questo studio, pertanto, rappresentano il primo riscontro sulla possibilità di predire l'efficacia della terapia con metformina attraverso la misurazione dei livelli di espressione di geni "target" coinvolti nella patogenesi dell'insulino-resistenza o nell'alterazione del metabolismo del glucosio.

Per spiegare come l'espressione di ENPP1 moduli l'efficacia farmacologica della metformina possiamo avanzare solo qualche ipotesi speculativa. E' possibile ipotizzare che l'interazione tra ENPP1 e metformina sia dovuta al differente effetto esercitato sul recettore insulinico. Infatti, uno degli effetti mediati dalla metformina è l'attivazione dell'AMPK, che up-regola l'espressione di IRS-1 attraverso l'inibizione della via mTOR [174-176]. La metformina, inoltre, inibisce la fosforilazione in serina di IRS-1 (Ser636/639) indotta dall'iperglicemia, riducendo l'inibizione sulla cascata del segnale insulinico [181]. Questi dati suggeriscono pertanto che in condizioni di "down regulation" del recettore insulinico (come nel caso dell'iper-espressione di ENPP1 e probabilmente anche nei portatori della variante Q di ENPP1) la metformina potrebbe esercitare un'efficacia ipoglicemizzante maggiore [135, 139, 182]. Diversi dati della letteratura riportano che la metformina ha un effetto positivo sul recettore insulinico negli eritrociti [183, 184], nei monociti e, soprattutto, negli epatociti [185].

Una migliore caratterizzazione di questi meccanismi potrebbe rivelarsi utile per la messa a punto di strategie di predizione dell'efficacia terapeutica del farmaco e quindi di terapie personalizzate per la cura del DMT2.

CONCLUSIONI GENERALI

Questi studi condotti durante questi 4 anni di dottorato suggeriscono che:

- a) il polimorfismo +276G>T del gene di adiponectina sembrerebbe essere coinvolto nei meccanismi che determinano il miglioramento della sensibilità insulinica e l'aumento dei livelli di adiponectinemia plasmatica dopo decremento ponderale;
- b) la variante K121Q del gene di ENPP1 associa sia con il grado di resistenza insulinica che con una ridotta capacità secretoria della beta cellula pancreatica e questo, probabilmente, potrebbe spiegare l'aumento del rischio di sviluppare il DMT2 nei soggetti portatori di tale polimorfismo. Infine, i livelli di espressione di mRNA di ENPP1 sono in grado di predire l'efficacia terapeutica del trattamento con metformina in pazienti con DMT2. I risultati di questo studio, pertanto, rappresentano il primo riscontro sulla possibilità di predire l'efficacia della terapia con metformina attraverso la misurazione dei livelli di espressione di geni "target" coinvolti nella patogenesi dell'insulino-resistenza o nell'alterazione del metabolismo del glucosio.

BIBLIOGRAFIA

1. Becker, K.G., *The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders*. Med Hypotheses, 2004. 62(2): p. 309-17.
2. Leahy, J.L., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res, 2005. 36(3): p. 197-209.
3. Porte, D., Jr., *Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Diabetes Metab Res Rev, 2001. 17(3): p. 181-8.
4. Flegal, K.M., et al., *Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008*. Jama. 303(3): p. 235-41.
5. Wang, Y., et al., *Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic*. Obesity (Silver Spring), 2008. 16(10): p. 2323-30.
6. Dietz, W.H., *Overweight in childhood and adolescence*. N Engl J Med, 2004. 350(9): p. 855-7.
7. Kimm, S.Y. and E. Obarzanek, *Childhood obesity: a new pandemic of the new millennium*. Pediatrics, 2002. 110(5): p. 1003-7.
8. Ogden, C.L., et al., *Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008*. Jama. 303(3): p. 242-9.
9. *Istituto nazionale di statistica (ISTAT): indagine sullo stato di salute e ricorso di servizi sanitari. 1999-2000*, Roma.
10. Baratta, R., et al., *High prevalence of overweight and obesity in 11-15-year-old children from Sicily*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. 16(4): p. 249-55.

11. Olshansky, S.J., et al., *A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century*. N Engl J Med, 2005. 352(11): p. 1138-45.
12. Baker, J.L., L.W. Olsen, and T.I. Sorensen, *Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood*. N Engl J Med, 2007. 357(23): p. 2329-37.
13. Bindon, J.R. and P.T. Baker, *Bergmann's rule and the thrifty genotype*. Am J Phys Anthropol, 1997. 104(2): p. 201-10.
14. Lev-Ran, A., *Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline*. Diabetes Metab Res Rev, 2001. 17(5): p. 347-62.
15. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. 894: p. i-xii, 1-253.
16. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract. 87(1): p. 4-14.
17. Deshpande, A.D., M. Harris-Hayes, and M. Schootman, *Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications*. Phys Ther, 2008. 88(11): p. 1254-64.
18. Narayan, K.M., et al., *Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden: U.S., 2005-2050*. Diabetes Care, 2006. 29(9): p. 2114-6.
19. Taylor, S.I., D. Accili, and Y. Imai, *Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM?* Diabetes, 1994. 43(6): p. 735-40.
20. Groop, L.C., E. Widen, and E. Ferrannini, *Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: errors of metabolism or of methods?* Diabetologia, 1993. 36(12): p. 1326-31.
21. Ferrannini, E., *Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects*. Endocr Rev, 1998. 19(4): p. 477-90.
22. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. 37(12): p. 1595-607.

23. Reaven, G.M., C.B. Hollenbeck, and Y.D. Chen, *Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance*. Diabetologia, 1989. 32(1): p. 52-5.
24. Lillioja, S., et al., *Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians*. N Engl J Med, 1993. 329(27): p. 1988-92.
25. Martin, B.C., et al., *Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study*. Lancet, 1992. 340(8825): p. 925-9.
26. Leahy, J.L., *Natural history of beta-cell dysfunction in NIDDM*. Diabetes Care, 1990. 13(9): p. 992-1010.
27. O'Rahilly, S.P., et al., *Beta-cell dysfunction, rather than insulin insensitivity, is the primary defect in familial type 2 diabetes*. Lancet, 1986. 2(8503): p. 360-4.
28. Pimenta, W., et al., *Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative*. Jama, 1995. 273(23): p. 1855-61.
29. Weyer, C., et al., *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1999. 104(6): p. 787-94.
30. Mokdad, A.H., et al., *The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States*. Jama, 2001. 286(10): p. 1195-200.
31. Felber, J.P. and A. Golay, *Pathways from obesity to diabetes*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. 26 Suppl 2: p. S39-45.
32. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. 414(6865): p. 782-7.

33. Cinti, S., et al., *Morphologic techniques for the study of brown adipose tissue and white adipose tissue*. Methods Mol Biol, 2001. 155: p. 21-51.
34. Cinti, S., *The adipose organ*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. 73(1): p. 9-15.
35. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(6): p. 2548-56.
36. Matsuzawa, Y., *The metabolic syndrome and adipocytokines*. FEBS Lett, 2006. 580(12): p. 2917-21.
37. Havel, P.J., *Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism*. Diabetes, 2004. 53 Suppl 1: p. S143-51.
38. Giorgino, F., L. Laviola, and J.W. Eriksson, *Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies*. Acta Physiol Scand, 2005. 183(1): p. 13-30.
39. Arner, P., et al., *Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions*. J Clin Invest, 1990. 86(5): p. 1595-600.
40. Bronnegard, M., et al., *Glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in different regions of human adipose tissue*. Endocrinology, 1990. 127(4): p. 1689-96.
41. Prunet-Marcassus, B., et al., *From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences*. Exp Cell Res, 2006. 312(6): p. 727-36.
42. Kirkland, J.L., C.H. Hollenberg, and W.S. Gillon, *Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. 20 Suppl 3: p. S102-7.
43. Janssen, I., P.T. Katzmarzyk, and R. Ross, *Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk*. Am J Clin Nutr, 2004. 79(3): p. 379-84.

44. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. 106(4): p. 473-81.
45. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. Jama, 2001. 285(19): p. 2486-97.
46. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. N Engl J Med, 2001. 344(18): p. 1343-50.
47. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. 346(6): p. 393-403.
48. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. 364(9438): p. 937-52.
49. Rodbell, M., *Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis*. J Biol Chem, 1964. 239: p. 375-80.
50. Rutkowski, J.M., K.E. Davis, and P.E. Scherer, *Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue*. Febs J, 2009. 276(20): p. 5738-46.
51. Rupnick, M.A., et al., *Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(16): p. 10730-5.
52. Brakenhielm, E., et al., *Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice*. Circ Res, 2004. 94(12): p. 1579-88.
53. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. J Lipid Res, 2005. 46(11): p. 2347-55.

54. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. 13(12): p. 4279-95.
55. Long, Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. J Clin Invest, 2006. 116(7): p. 1776-83.
56. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nature, 2002. 415(6869): p. 339-43.
57. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002.
58. Freidenberg, G.R., et al., *Decreased kinase activity of insulin receptors from adipocytes of non-insulin-dependent diabetic subjects*. J Clin Invest, 1987. 79(1): p. 240-50.
59. Freidenberg, G.R., et al., *Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss*. J Clin Invest, 1988. 82(4): p. 1398-406.
60. Kashyap, S., et al., *A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. 52(10): p. 2461-74.
61. Gulli, G., et al., *The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents*. Diabetes, 1992. 41(12): p. 1575-86.
62. Perseghin, G., et al., *Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study*. Diabetes, 1997. 46(6): p. 1001-9.
63. Virkamaki, A., et al., *Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle*. Diabetes, 2001. 50(10): p. 2337-43.

64. Brassard, P., et al., *Impaired plasma nonesterified fatty acid tolerance is an early defect in the natural history of type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. 93(3): p. 837-44.
65. Muhlhausler, B. and S.R. Smith, *Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte*. Trends Endocrinol Metab, 2009. 20(2): p. 51-7.
66. Isganaitis, E., et al., *Accelerated postnatal growth increases lipogenic gene expression and adipocyte size in low-birth weight mice*. Diabetes, 2009. 58(5): p. 1192-200.
67. Bogacka, I., et al., *The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo*. Diabetes Care, 2004. 27(7): p. 1660-7.
68. Hotamisligil, G.S. and E. Erbay, *Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(12): p. 923-34.
69. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review*. Gerontology, 2009. 55(4): p. 379-86.
70. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
71. Gregor, M.F., et al., *Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss*. Diabetes, 2009. 58(3): p. 693-700.
72. Unger, R.H. and Y.T. Zhou, *Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover*. Diabetes, 2001. 50 Suppl 1: p. S118-21.
73. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction*. Endocr Rev, 2008. 29(3): p. 351-66.
74. Scherer, P.E., *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ*. Diabetes, 2006. 55(6): p. 1537-45.

75. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. 270(45): p. 26746-9.
76. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. 394(6695): p. 790-3.
77. Cook, K.S., et al., *Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve*. Science, 1987. 237(4813): p. 402-5.
78. Rajala, M.W., et al., *Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production*. J Clin Invest, 2003. 111(2): p. 225-30.
79. Yang, R.Z., et al., *Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. 290(6): p. E1253-61.
80. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. 307(5708): p. 426-30.
81. Ye, J., *Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance*. Int J Obes (Lond), 2009. 33(1): p. 54-66.
82. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apMI (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 221(2): p. 286-9.
83. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. 271(18): p. 10697-703.
84. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem (Tokyo), 1996. 120(4): p. 803-12.
85. Shapiro, L. and P.E. Scherer, *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor*. Curr Biol, 1998. 8(6): p. 335-8.

86. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. Blood, 2000. 96(5): p. 1723-32.
87. Pajvani, U.B., et al., *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9073-85.
88. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2006. 116(7): p. 1784-92.
89. Wang, Y., et al., *Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex*. J Biol Chem, 2006. 281(24): p. 16391-400.
90. Wang, Y., et al., *Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity*. J Biol Chem, 2002. 277(22): p. 19521-9.
91. Wang, Y., et al., *Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin*. Proteomics, 2006. 6(13): p. 3862-70.
92. Fruebis, J., et al., *Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(4): p. 2005-10.
93. Tomas, E., et al., *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(25): p. 16309-13.
94. Berg, A.H., et al., *The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*. Nat Med, 2001. 7(8): p. 947-53.

95. Combs, T.P., et al., *Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30*. J Clin Invest, 2001. 108(12): p. 1875-81.
96. Nawrocki, A.R., et al., *Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists*. J Biol Chem, 2006. 281(5): p. 2654-60.
97. Combs, T.P., et al., *A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity*. Endocrinology, 2004. 145(1): p. 367-83.
98. Kim, J.Y., et al., *Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue*. J Clin Invest, 2007. 117(9): p. 2621-37.
99. Qi, Y., et al., *Adiponectin acts in the brain to decrease body weight*. Nat Med, 2004. 10(5): p. 524-9.
100. Ohashi, K., et al., *Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension*. Hypertension, 2006. 47(6): p. 1108-16.
101. Ouchi, N., R. Shibata, and K. Walsh, *Cardioprotection by adiponectin*. Trends Cardiovasc Med, 2006. 16(5): p. 141-6.
102. Shibata, R., et al., *Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart*. Nat Med, 2004. 10(12): p. 1384-9.
103. Shibata, R., et al., *Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms*. Nat Med, 2005. 11(10): p. 1096-103.
104. Shibata, R., et al., *Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2004. 279(27): p. 28670-4.

105. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, *Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome*. J Intern Med, 2005. 257(2): p. 167-75.
106. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. 96(9): p. 939-49.
107. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 257(1): p. 79-83.
108. Tschritter, O., et al., *Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism*. Diabetes, 2003. 52(2): p. 239-43.
109. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(5): p. 1930-5.
110. Kojima, S., et al., *The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction*. Heart, 2003. 89(6): p. 667.
111. Kumada, M., et al., *Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(1): p. 85-9.
112. Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. Jama, 2004. 291(14): p. 1730-7.
113. Civitarese, A.E., et al., *Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2004. 47(5): p. 816-20.
114. Cnop, M., et al., *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex*. Diabetologia, 2003. 46(4): p. 459-69.

115. Yamamoto, Y., et al., *Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population*. Clin Sci (Lond), 2002. 103(2): p. 137-42.
116. Ouchi, N., et al., *Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity*. Hypertension, 2003. 42(3): p. 231-4.
117. Ouchi, N., et al., *Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease*. Curr Opin Lipidol, 2003. 14(6): p. 561-6.
118. Krakoff, J., et al., *Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian*. Diabetes Care, 2003. 26(6): p. 1745-51.
119. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. Circulation, 1999. 100(25): p. 2473-6.
120. Ouchi, N., et al., *Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway*. Circulation, 2000. 102(11): p. 1296-301.
121. Herrera, R. and O.M. Rosen, *Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation*. J Biol Chem, 1986. 261(26): p. 11980-5.
122. Perlman, R., et al., *Conformational changes in the alpha- and beta-subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies*. J Biol Chem, 1989. 264(15): p. 8946-50.
123. Maddux, B.A. and I.D. Goldfine, *Evidence that insulin plus ATP may induce a conformational change in the beta subunit of the insulin receptor without inducing receptor autophosphorylation*. J Biol Chem, 1991. 266(11): p. 6731-6.
124. Rosen, O.M., *After insulin binds*. Science, 1987. 237(4821): p. 1452-8.

125. Tornqvist, H.E., et al., *Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro*. J Biol Chem, 1987. 262(21): p. 10212-9.
126. Wilden, P.A., et al., *The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies*. J Biol Chem, 1992. 267(19): p. 13719-27.
127. Chou, C.K., et al., *Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin*. J Biol Chem, 1987. 262(4): p. 1842-7.
128. Ebina, Y., et al., *Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(3): p. 704-8.
129. Wilden, P.A., et al., *Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function*. J Biol Chem, 1992. 267(23): p. 16660-8.
130. Proud, C.G., *Translation. Turned on by insulin*. Nature, 1994. 371(6500): p. 747-8.
131. Taylor, S.I., *Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene*. Diabetes, 1992. 41(11): p. 1473-90.
132. Du, K., et al., *TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver*. Science, 2003. 300(5625): p. 1574-7.
133. Sbraccia, P., et al., *Production of inhibitor of insulin-receptor tyrosine kinase in fibroblasts from patient with insulin resistance and NIDDM*. Diabetes, 1991. 40(2): p. 295-9.
134. Maddux, B.A., et al., *Inhibitors of insulin receptor tyrosine kinase in fibroblasts from diverse patients with impaired insulin action: evidence for a novel mechanism of postreceptor insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 77(1): p. 73-9.

135. Maddux, B.A., et al., *Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Nature*, 1995. 373(6513): p. 448-51.
136. Frittitta, L., et al., *PC-1 content in skeletal muscle of non-obese, non-diabetic subjects: relationship to insulin receptor tyrosine kinase and whole body insulin sensitivity*. *Diabetologia*, 1996. 39(10): p. 1190-5.
137. Maddux, B.A. and I.D. Goldfine, *Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit*. *Diabetes*, 2000. 49(1): p. 13-9.
138. Youngren, J.F., et al., *Skeletal muscle content of membrane glycoprotein PC-1 in obesity. Relationship to muscle glucose transport*. *Diabetes*, 1996. 45(10): p. 1324-8.
139. Frittitta, L., et al., *Increased adipose tissue PC-1 protein content, but not tumour necrosis factor-alpha gene expression, is associated with a reduction of both whole body insulin sensitivity and insulin receptor tyrosine-kinase activity*. *Diabetologia*, 1997. 40(3): p. 282-9.
140. Stefanovic, V., et al., *Reversal of increased lymphocyte PC-1 activity in patients with type 2 diabetes treated with metformin*. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999. 15(6): p. 400-4.
141. Pizzuti, A., et al., *A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance*. *Diabetes*, 1999. 48(9): p. 1881-4.
142. Costanzo, B.V., et al., *The Q allele variant (GLN121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS121)*. *Diabetes*, 2001. 50(4): p. 831-6.
143. Abate, N., et al., *ENPP1/PC-1 K121Q polymorphism and genetic susceptibility to type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2005. 54(4): p. 1207-13.

144. Stolerman, E.S., et al., *Haplotype structure of the ENPP1 Gene and Nominal Association of the K121Q missense single nucleotide polymorphism with glycemic traits in the Framingham Heart Study*. Diabetes, 2008. 57(7): p. 1971-7.
145. Weedon, M.N., et al., *No evidence of association of ENPP1 variants with type 2 diabetes or obesity in a study of 8,089 U.K. Caucasians*. Diabetes, 2006. 55(11): p. 3175-9.
146. Seo, H.J., S.G. Kim, and O.J. Kwon, *The K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) is not associated with type 2 diabetes or obesity in Korean male workers*. J Korean Med Sci, 2008. 23(3): p. 459-64.
147. Grarup, N., et al., *Studies of the relationship between the ENPP1 K121Q polymorphism and type 2 diabetes, insulin resistance and obesity in 7,333 Danish white subjects*. Diabetologia, 2006. 49(9): p. 2097-104.
148. McAteer, J.B., et al., *The ENPP1 K121Q polymorphism is associated with type 2 diabetes in European populations: evidence from an updated meta-analysis in 42,042 subjects*. Diabetes, 2008. 57(4): p. 1125-30.
149. Baratta, R., et al., *Role of the ENPP1 K121Q polymorphism in glucose homeostasis*. Diabetes, 2008. 57(12): p. 3360-4.
150. Yang, W.S., et al., *Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(8): p. 3815-9.
151. Baratta, R., et al., *Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(6): p. 2665-71.
152. Stefan, N. and M. Stumvoll, *Adiponectin - its role in metabolism and beyond*. Horm Metab Res, 2002. 34(9): p. 469-74.
153. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. 26(3): p. 439-51.

154. Menzaghi, C., V. Trischitta, and A. Doria, *Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease*. Diabetes, 2007. 56(5): p. 1198-209.
155. Hivert, M.F., et al., *Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study*. Diabetes, 2008. 57(12): p. 3353-9.
156. Zacharova, J., J.L. Chiasson, and M. Laakso, *The common polymorphisms (single nucleotide polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the adiponectin gene predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial*. Diabetes, 2005. 54(3): p. 893-9.
157. Bouatia-Naji, N., et al., *ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity*. Diabetes, 2006. 55(2): p. 545-50.
158. Matsuda, M. and R.A. DeFronzo, *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp*. Diabetes Care, 1999. 22(9): p. 1462-70.
159. Shin, M.J., et al., *The association of SNP276G>T at adiponectin gene with circulating adiponectin and insulin resistance in response to mild weight loss*. Int J Obes (Lond), 2006. 30(12): p. 1702-8.
160. Mackevics, V., et al., *The adiponectin gene is associated with adiponectin levels but not with characteristics of the insulin resistance syndrome in healthy Caucasians*. Eur J Hum Genet, 2006. 14(3): p. 349-56.
161. Case, C.C., et al., *Impact of weight loss on the metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2002. 4(6): p. 407-14.
162. Haluzik, M., J. Parizkova, and M.M. Haluzik, *Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications*. Physiol Res, 2004. 53(2): p. 123-9.

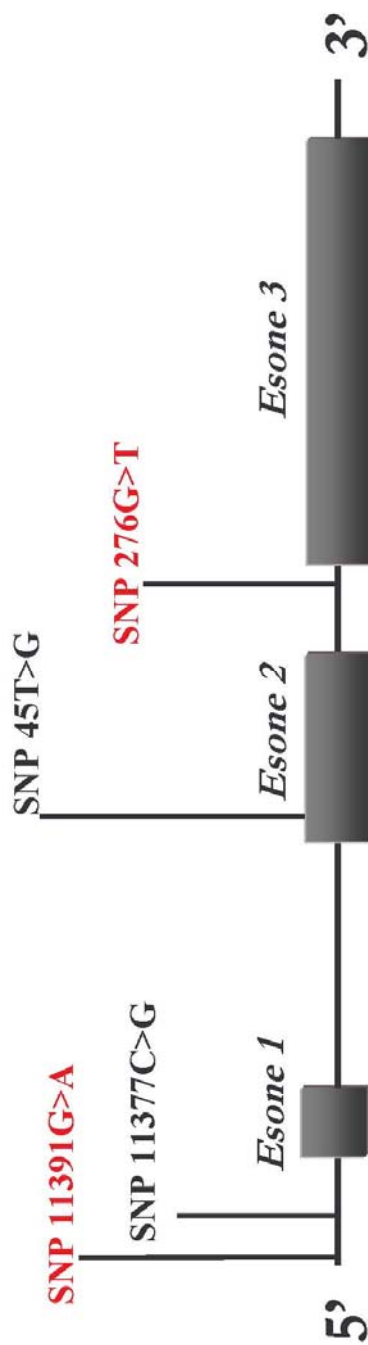
163. Hara, K., et al., *Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population*. Diabetes, 2002. 51(2): p. 536-40.
164. Faraj, M., et al., *Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(4): p. 1594-602.
165. Bacci, S., et al., *The K121Q polymorphism of the ENPP1/PC-1 gene is associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and myocardial infarction*. Diabetes, 2005. 54(10): p. 3021-5.
166. Bochenski, J., et al., *New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals*. Diabetes, 2006. 55(9): p. 2626-30.
167. Prudente, S., et al., *The Q121/Q121 genotype of ENPP1/PC-1 is associated with lower BMI in non-diabetic whites*. Obesity (Silver Spring), 2007. 15(1): p. 1-4.
168. Nathan, D.M., et al., *Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes*. Diabetes Care, 2009. 32(1): p. 193-203.
169. Bailey, C.J. and R.C. Turner, *Metformin*. N Engl J Med, 1996. 334(9): p. 574-9.
170. DeFronzo, R.A., N. Barzilai, and D.C. Simonson, *Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. 73(6): p. 1294-301.
171. Stumvoll, M., et al., *Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1995. 333(9): p. 550-4.

172. Johnson, A.B., et al., *The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients.* Metabolism, 1993. 42(9): p. 1217-22.
173. Dorella, M., et al., *Improvement of insulin sensitivity by metformin treatment does not lower blood pressure of nonobese insulin-resistant hypertensive patients with normal glucose tolerance.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81(4): p. 1568-74.
174. Foretz, M., et al., *Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state.* J Clin Invest. 120(7): p. 2355-69.
175. Kalender, A., et al., *Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner.* Cell Metab. 11(5): p. 390-401.
176. Lim, C.T., B. Kola, and M. Korbonsits, *AMPK as a mediator of hormonal signalling.* J Mol Endocrinol. 44(2): p. 87-97.
177. Abate, N., et al., *Mechanisms of disease: Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 as a 'gatekeeper' of insulin receptors.* Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. 2(12): p. 694-701.
178. Jablonski, K.A., et al., *Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program.* Diabetes. 59(10): p. 2672-81.
179. Moore, A.F., et al., *The association of ENPP1 K121Q with diabetes incidence is abolished by lifestyle modification in the diabetes prevention program.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. 94(2): p. 449-55.
180. Mussig, K., et al., *The ENPP1 K121Q polymorphism determines individual susceptibility to the insulin-sensitising effect of lifestyle intervention.* Diabetologia. 53(3): p. 504-9.

181. Tzatsos, A. and K.V. Kandror, *Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2006. 26(1): p. 63-76.
182. Frittitta, L., et al., *Elevated PC-1 content in cultured skin fibroblasts correlates with decreased in vivo and in vitro insulin action in nondiabetic subjects: evidence that PC-1 may be an intrinsic factor in impaired insulin receptor signaling*. Diabetes, 1998. 47(7): p. 1095-100.
183. Holle, A., et al., *Biguanide treatment increases the number of insulin-receptor sites on human erythrocytes*. N Engl J Med, 1981. 305(10): p. 563-6.
184. Santos, R.F., et al., *Effect of metformin on insulin-stimulated tyrosine kinase activity of erythrocytes from obese women with normal glucose tolerance*. Diabetes Metab, 1997. 23(2): p. 143-8.
185. Gunton, J.E., et al., *Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(3): p. 1323-32.

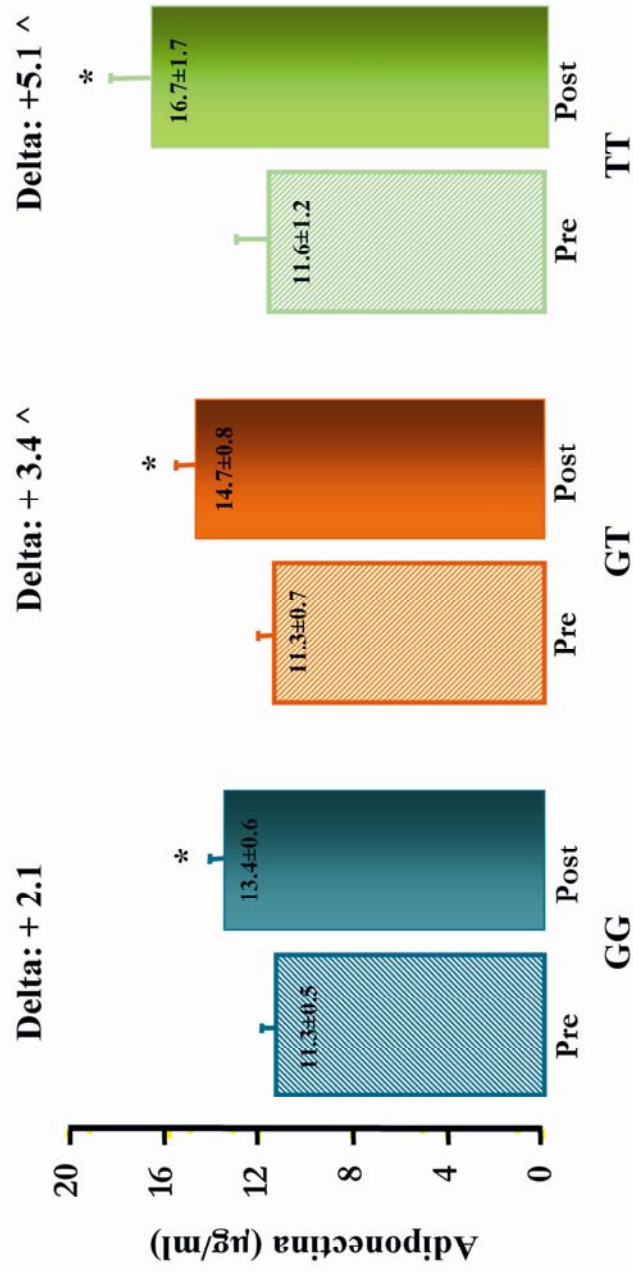
FIGURE E TABELLE STUDIO A

Figura 1: Schema semplificato del gene di adiponectina e dei polimorfismi più studiati



SNP= Single Nucleotide Polymorphism

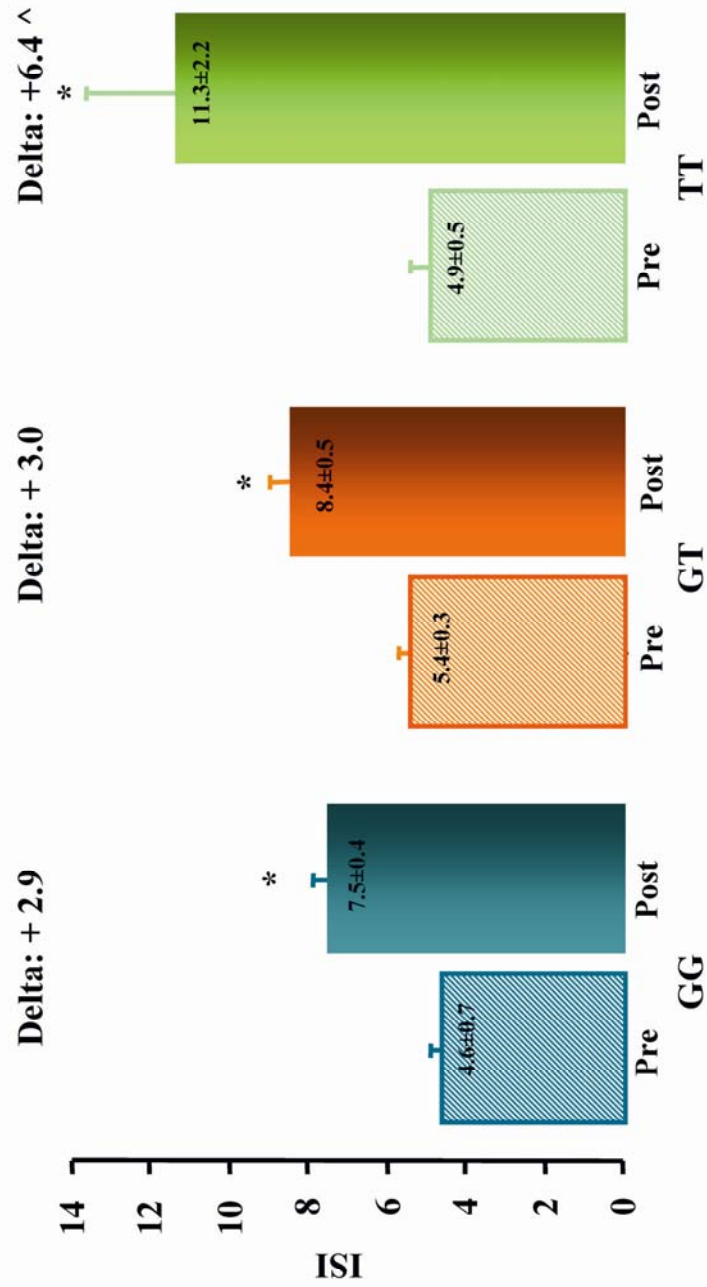
Figura 2: Livelli plasmatici di adiponectina prima (pre) e dopo (post) decremento ponderale in base al genotipo +276G>T



Delta: valore post - valore pre dei livelli plasmatici di adiponectina

* $p < 0.01$ vs stesso genotipo, t-test per dati appaiati; $^{\wedge}p < 0.05$ vs GG, Anova test) Dati corretti per età, sesso e decremento ponderale

Figura 3: Sensibilità Insulinica (ISI) prima (pre) e dopo (post) decremento ponderale in base al genotipo +276G>T



Delta: valore post - valore pre dei valori di ISI

*p<0.01 vs stesso genotipo, t-test per dati appaiati; [^]p<0.01 vs GG e GT, Anova test. Dati corretti per età, sesso e decremento ponderale

Figura 4: Delta (valore post - valore pre) dell'adiponectina plasmatica e dell'ISI in base al genotipo +276G>T nel modello recessivo

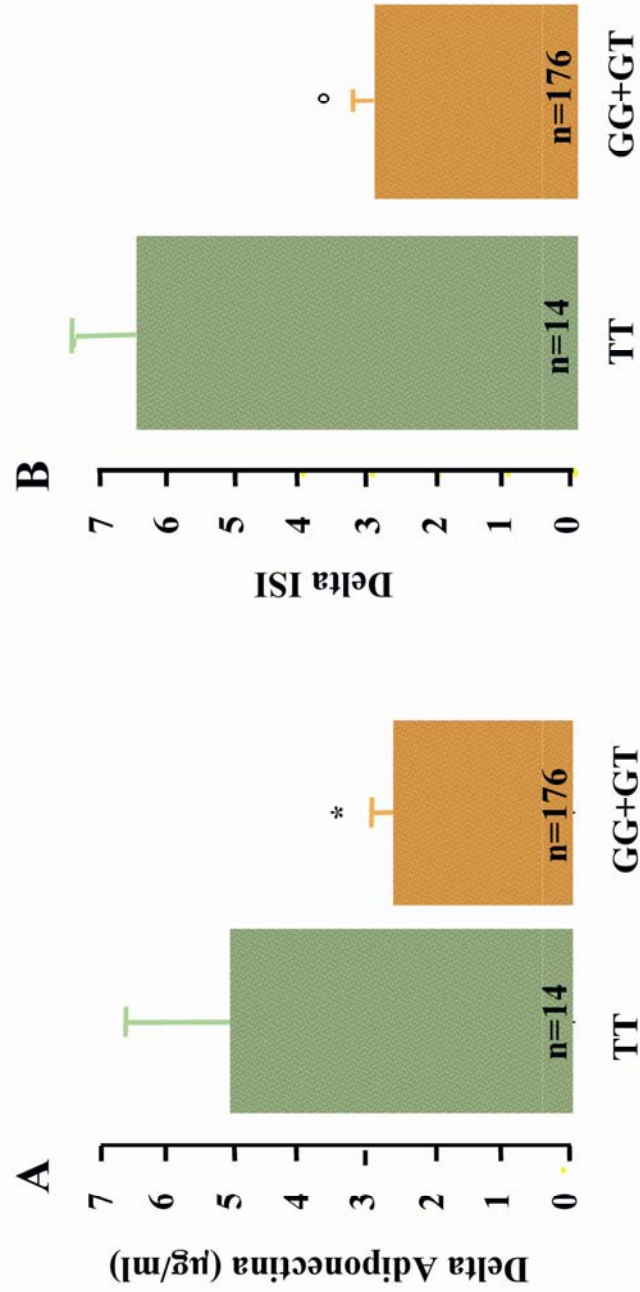


Tabella 1: Percentuale dei genotipi e frequenza allelica degli SNPs +276G>T e -11391G>A nella popolazione studiata

<i>SNP</i>	<i>N° alleli</i>	<i>Genotipo (%)</i>	<i>Frequenza Allelica (%)</i>
+276G>T	380	GG (53.1) GT (39.5) TT (7.4)	G (73.0) T (27.0)
-11391G>A	380	GG (84.7) GA (15.3) AA /	G (92.4) A (7.6)

SNP= Single Nucleotide Polymorphism

**Tabella 2: Caratteristiche generali della popolazione studiata
in base al genotipo**

+276G>T			-11391G>A		
	<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>	<i>GG</i>	<i>GA</i>
N	101	75	14	161	29
M/F	27/74	16/59	2/12	39/122	6/23
ETA'	36.4±1.2	33.3±1.2	36.9±2.6	35.1±0.9	36.2±1.0
BMI	45.8±0.7	44.2±0.7	42.1±2.4	44.8±0.5	45.4±1.3

N= numero di pazienti; M= maschi; F= femmine; età= anni; BMI= Body Mass Index, kg/m².

Tabella 3: Parametri antropometrici e glicometabolici di base e dopo decremento ponderale per il genotipo +276G>T

	GG (n=101)		GT (n=75)		TT (n=14)	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
BMI (cm)	45.8±0.7	38.5±0.6*	44.2±0.7	37.0±0.6*	42.1±2.4	35.5±2.4*
Vita (cm)	128.5±1.4	114.8±1.4*	127.1±1.5	112.6±1.6*	120.9±4.6	110.2±4.9°
PAS (mmHg)	125.7±1.3	118.9±1.1°	123.5±1.7	119.4±1.5°	123.7±3.4	117.4±3.5
PAD (mmHg)	80.5±0.9	76.2±0.8°	79.7±1.3	76.6±0.9°	80.4±3.0	74.2±2.6 [#]
Glicemia (mg/dl)	98.9±1.2	91.5±1.1*	96.0±1.3	92.1±1.6 [#]	94.7±2.0	91.0±2.4
Insulina (mU/l)	19.0±0.8	13.7±0.7*	18.8±1.2	13.3±0.9*	18.3±2.2	12.6±2.7 [#]
HDL (mg/dl)	45.6±1.3	46.0±1.3	44.7±1.2	46.6±1.4	50.0±4.1	49.3±3.3
Tg (mg/dl)	115.2±5.2	94.9±4.1*	120.7±7.3	96.3±7.4°	109.2±7.9	84.0±7.3°

•*p*<0.0001; ° *p*<0.01; [#] *p*< 0.05 vs valore basale dello stesso genotipo, *t*-test per dati appaiati

PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; Tg: trigliceridi. Dati corretti per età, sesso e decremento ponderale

Tabella 4: Parametri antropometrici e glicometabolici di base e dopo decremento ponderale per il genotipo -11391G>A

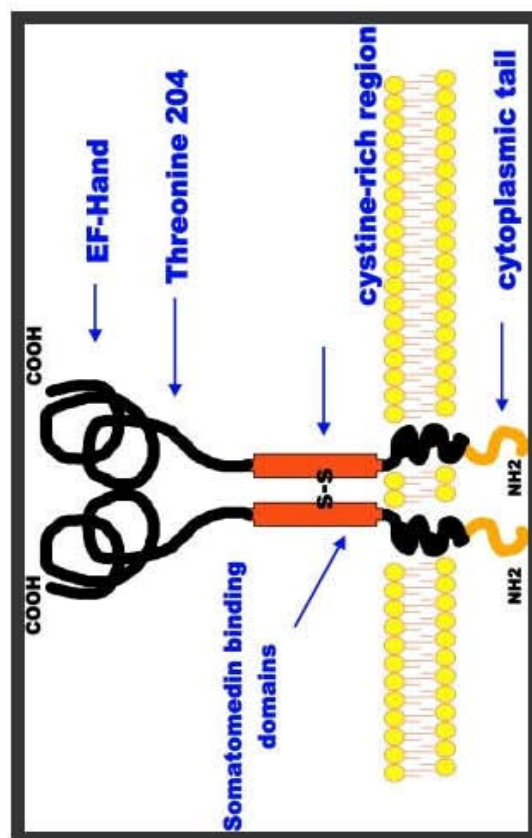
	GG (n=161)		GA (n=29)	
	PRE	POST	PRE	POST
BMI (cm)	44.8±0.5	37.6±0.5*	45.4±1.3	38.0±0.4*
Vita (cm)	127.3±1.1	113.2±0.1*	127.5±2.9	115.6±3.0*
PAS (mmHg)	124.7±1.1	120.0±2.2*	124.3±1.9	118.8±0.9 [#]
PAD (mmHg)	80.4±0.8	76.1±0.6*	78.8±1.7	76.9±1.6
Glicemia (mg/dl)	96.8±0.9	91.3±0.9*	101.2±2.6	93.8±2.6 [#]
Insulina mU/l	18.9±0.7	13.2±0.6*	18.7±2.0	14.9±1.5 [#]
HDL-col (mg/dl)	45.3±0.9	46.1±1.0	47.1±2.5	48.3±1.8
Tg (mg/dl)	115.9±4.4	95.0±4.1*	122.6±11.0	92.9±7.5°
ISI	4.9±0.2	8.2±0.4*	5.5±0.6	7.8±0.7°
ADIPOQ (mg/dl)	11.1±0.4	13.8±0.5*	12.4±1.0	16.0±1.3°

* $p<0.0001$; ° $p<0.01$; [#] $p<0.05$ vs valore pre nello stesso genotipo, t-test per dati appaiati

PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; HDL-col: colesterolo HDL; Tg: trigliceridi; ADIPOQ: adiponectina. Dati corretti per età, sesso e decremento ponderale

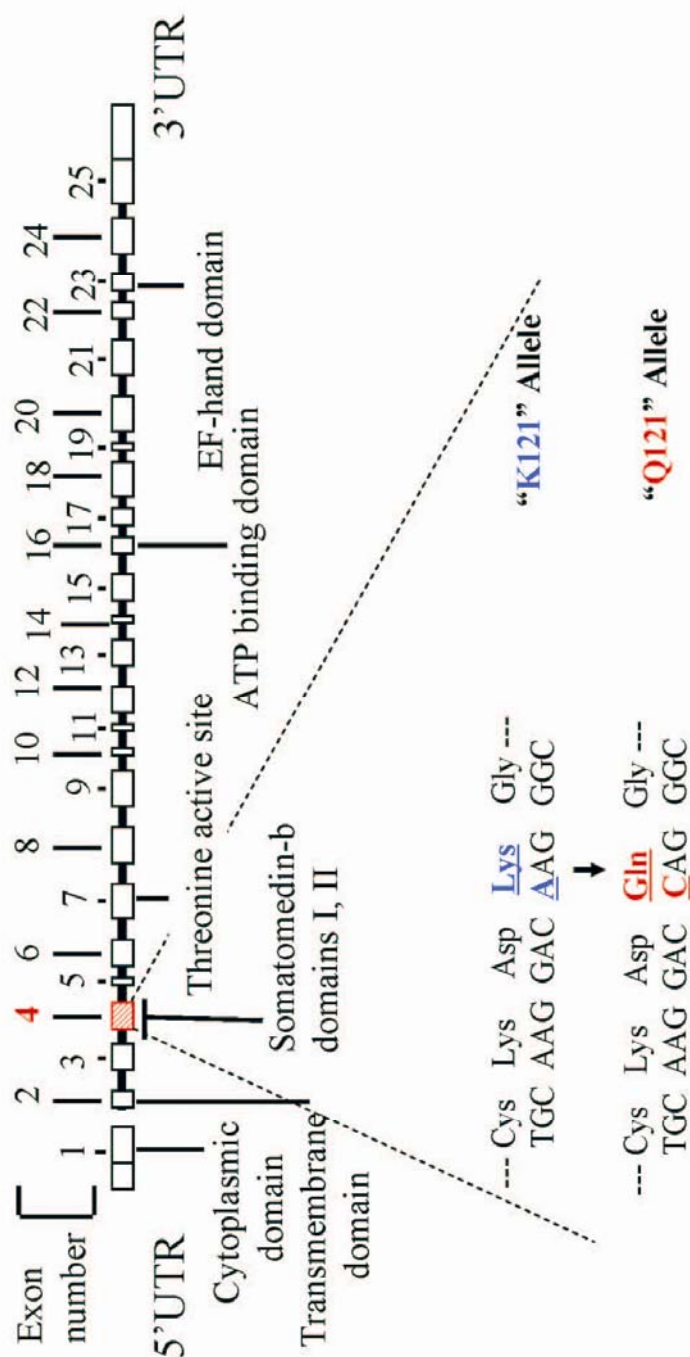
FIGURE E TABELLE STUDIO B

Figura 5: Schema semplificato di ENPP1



EF-Hand: sito di legame del calcio

Figura 6: Struttura del gene di ENPP1 umano e polimorfismo K121Q dell'esone 4



EF-Hand domain: sito di legame del calcio

Figura 7: Profilo glicemico ed insulinemico durante OGTT negli adulti

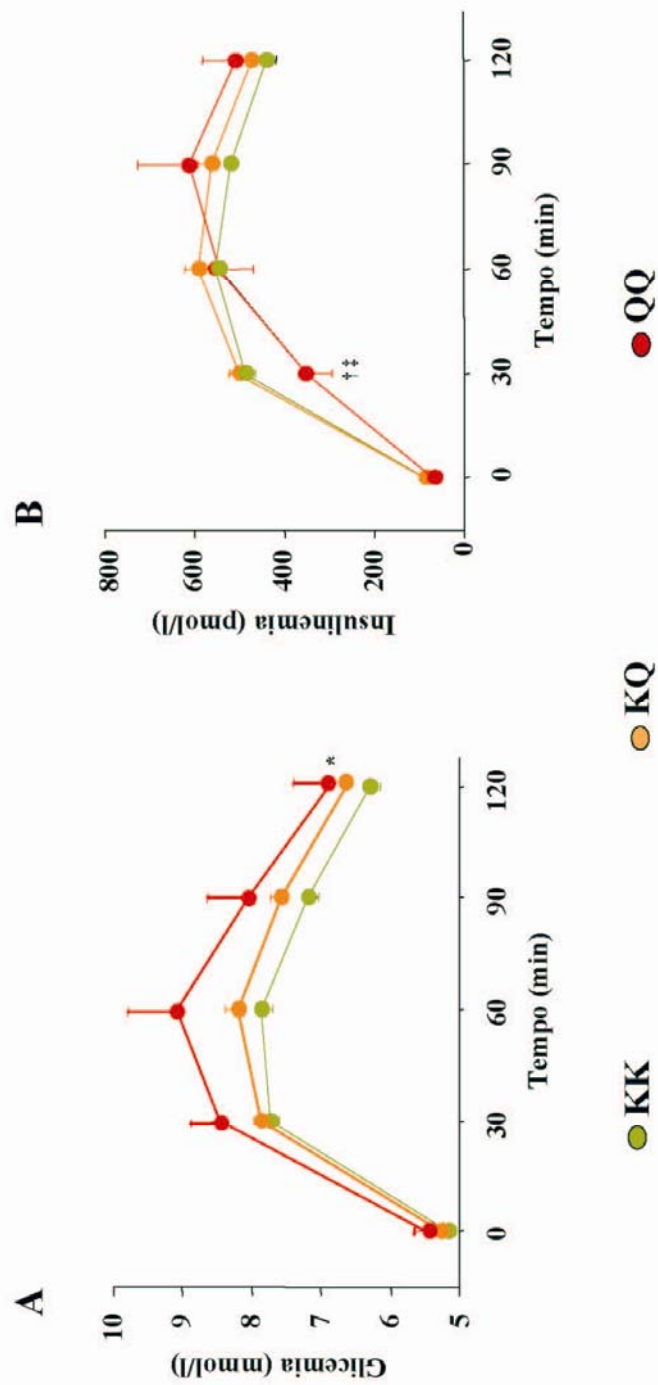


Grafico A: * $p < 0.05$ QQ vs. KK; Anova per misure ripetute. **Grafico B:** † $p < 0.0001$ QQ vs. KQ; ‡ $p < 0.0001$ QQ vs. KK, † test per dati appaiati

Figura 8: Parametri metabolici derivati dall'OGTT negli adulti

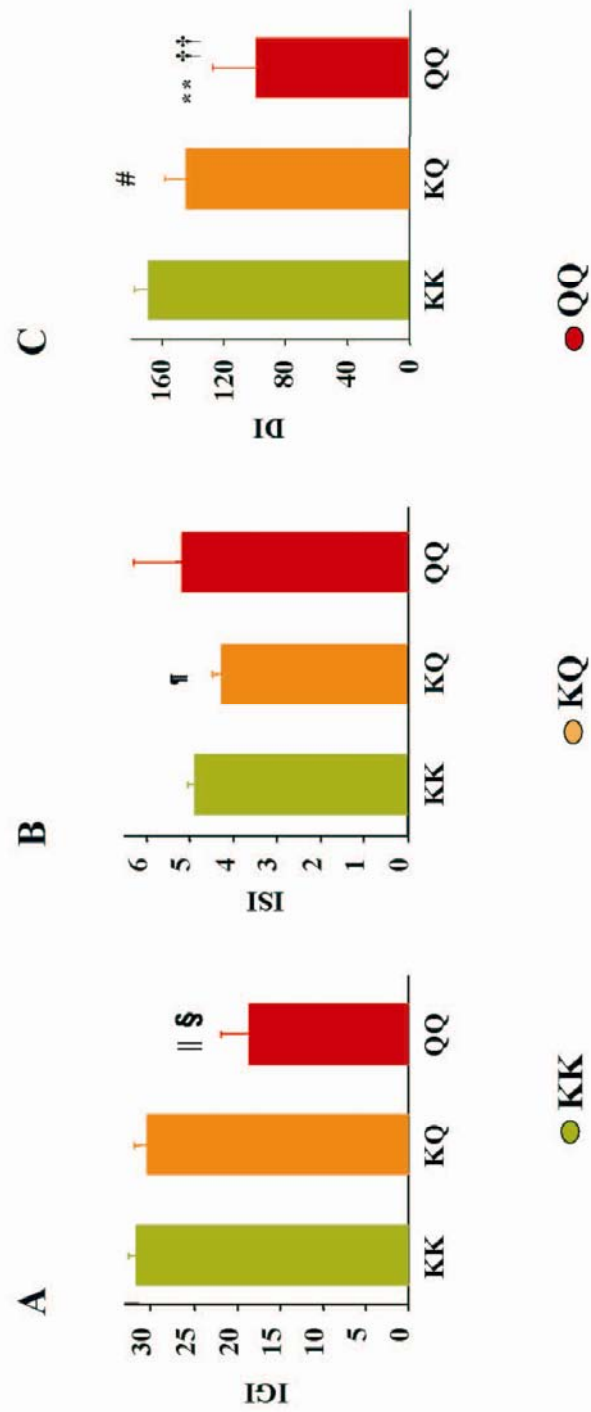


Grafico A: § $p < 0.0001$ QQ vs. KQ, || $p < 0.0001$ QQ vs. KK; **Grafico B:** ¶ $p < 0.05$ KQ vs. KK; **Grafico C:** # $p < 0.01$ KQ vs. KK, ** $p < 0.001$ QQ vs. KK; † $p < 0.01$ QQ vs. KQ

Figura 9: Correlazione tra BMI ed ISI nei genotipi del K121Q di ENPP1

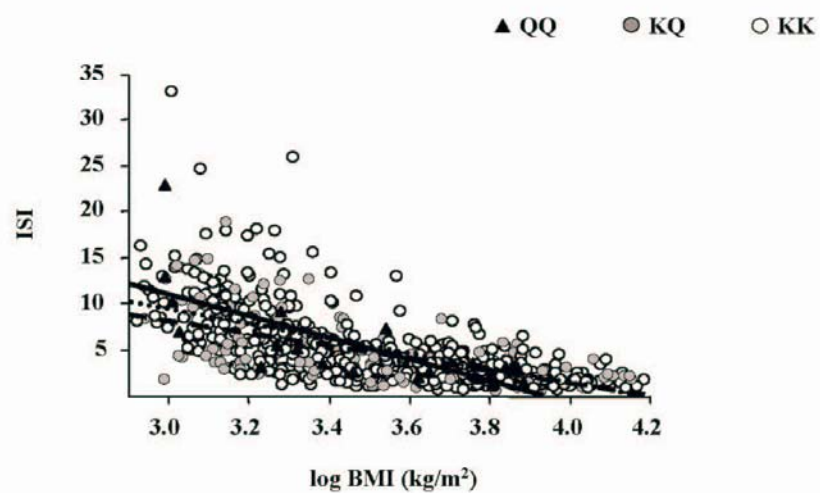


Figura 10: Profilo glicemico ed insulinemico durante OGTT nei bambini

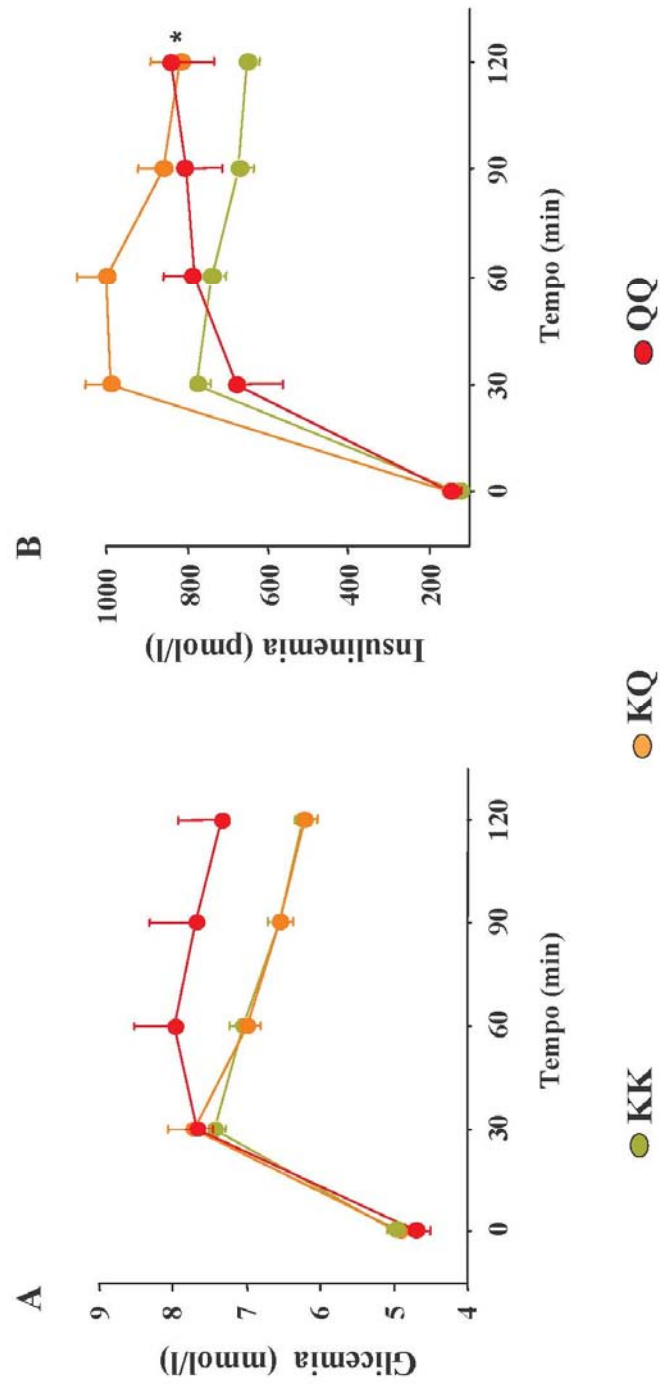


Grafico B: * $p < 0.01$ KQ vs. KK.

Figura 11: Parametri metabolici derivati dall'OGTT nei bambini

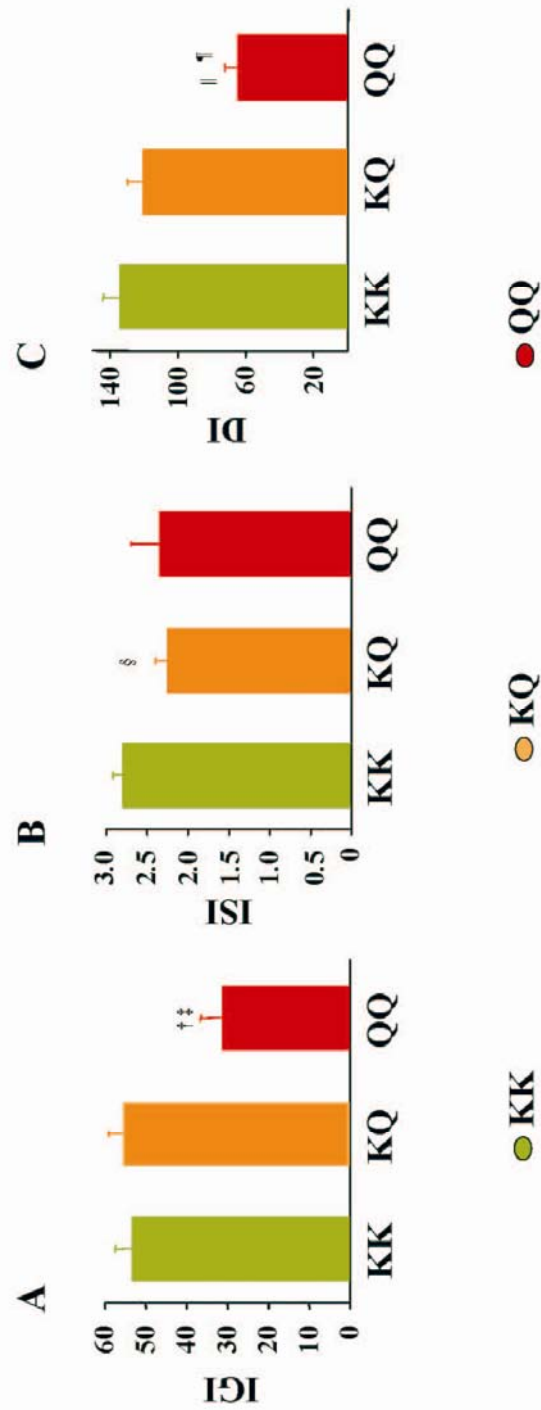


Grafico A: * $p < 0.001$ QQ vs. KQ, : * $p < 0.05$ QQ vs. KK. **Grafico B:** § $p < 0.01$ KQ vs. K. **Grafico C:** § $p < 0.05$ QQ vs. KQ, ¶ $p < 0.01$ QQ vs. KK.

TABELLE STUDIO C

Tabella 6 Caratteristiche cliniche dei pazienti studiati

Numero di soggetti (Maschi/Femmine)	62 (36/26)
Età (anni)	58.6±7.6
BMI (Kg/m ²)	32.7±7.2
HbA1c (%)	7.3±0.7
Durata della malattia diabetica (anni)	8.6±6.4
Dislipidemia (%)	90.3
Ipertensione (%)	87.1
Terapia antidiabetica (dieta) (%)	12.9
Terapia antidiabetica (dieta e ipoglicemizzanti orali) (%)	87.1

Dati espressi come media±DS; BMI: body mass index; per dislipidemia ed ipertensione vedi metodi

Tabella 7: Effetto di 3 mesi di trattamento con metformina sulle variabili correlate all'insulino resistenza

	pre-metformina	Post-metformina	p
BMI (Kg/m ²)	32.7±7.2	31.8±7.1	<0.0001
Glicemia (mg/dl)	173.0±43.8	147.1±37.8	<0.0001
HOMA-IR	4.0±2.3	3.2±2.2	0.002
HDL-colesterolo (mg/dl)	41.2±10.5	44.1±10.8	<0.001
Trigliceridi (mg/dl)	131.6±71.6	128.3±70.5	0.50

Dati espressi come media ±DS; BMI: body mass index; Homa-IR: homeostatic model of assessment of insulin resistance (vedi metodi).

Tabella 8: Univariata utilizzando l'efficacia della metformina come variabile dipendente

	p	R ²	Coefficiente β
Espressione ENPP1 (UA)	0.03	0.07	13.65
Sesso (M=0/F=1)	0.05	0.06	17.12
Età (anni)	0.77	0.001	-0.17
Durata della malattia (anni)	0.58	0.01	0.38
BMI (Kg/m ²)	0.74	0.00	-0.21
Glicemia a digiuno (mg/dl)	0.001	0.31	0.44
HOMA-IR	0.14	0.04	2.90

ENPP1 (vedi metodi); M: maschi; F: femmine; BMI: body mass index; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment of Insulin Resistance (vedi metodi)