



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO IN SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE

XXX CICLO

---

**Genetica del Diabete di tipo 2 e del rischio  
cardiovascolare: ruolo del sistema Vitamina D -  
Recettore della vitamina D (VDR) e di altri geni di  
susceptibilità**

**Tutor:**

Prof. Marco Giorgio Baroni

**Candidata:**

Laura Bertocchini

Matricola n°:1174313

---

**Anno accademico: 2016/2017**

## **Ringraziamenti**

*Il primo ringraziamento va al mio tutor di Dottorato, il Prof. Marco Giorgio Baroni, per tutto ciò che mi ha insegnato, per avermi fatto appassionare alla ricerca, per aver condiviso con me la sua immensa conoscenza e per la gentilezza, la cordialità e la fiducia dimostrate ogni giorno nei miei confronti.*

*Grazie alla Dott.ssa Federica Sentinelli, che in questi 3 anni trascorsi insieme mi ha trasmesso tutte le sue competenze, mi ha insegnato il metodo e la precisione alla base di questo lavoro ed è diventata una cara amica.*

*Ringrazio infine la Prof. Maria Gisella Cavallo, che ormai da anni è il mio punto di riferimento. Senza di lei questo bellissimo percorso non sarebbe mai iniziato e le sono immensamente grata per la fiducia che ha riposto in me.*

# INDICE

<u>INTRODUZIONE GENERALE</u>	8
<u>VITAMINA D</u>	
Introduzione	12
Determinanti dello stato di vitamina D: assunzione e metabolismo	12
Ipovitaminosi D	16
Diabete e vitamina D	17
Determinanti dello stato di vitamina D: focus sulle varianti genetiche	19
<u>GENI COINVOLTI NEL METABOLISMO DELLA VITAMINA D</u>	
DHCR7 (7 deidro-colesterolo reductasi)	21
CYP2R1 (vitamina D 25 idrossilasi)	21
GC/DBP (vitamin D binding protein)	22
VDR (Vitamin D Receptor)	23
Polimorfismi del gene VDR: rs11568820	24
rs2228570	25
<u>STUDIO DELLE BASI GENETICHE DELLE MALATTIE</u>	
Aspetti metodologici	26
<u>I POLIMORFISMI GENICI</u>	28
SNP (single nucleotide polymorphisms, polimorfismi di singoli nucleotidi)	29

<u>SCOPO DELLO STUDIO</u>	30
---------------------------	----

### 1) SCOPI SPECIFICI

a. <u>Analisi di associazione dello SNP rs11568820 del gene VDR con il DT2 in una coorte caso-controllo</u>	32
---	----

#### MATERIALI E METODI

Popolazione	32
Esame clinico e indagini ematochimiche	33
Indici di insulino-resistenza e insulino-secrezione	33
Genetica	34
Statistica	34

<u>RISULTATI</u>	35
------------------	----

<u>DISCUSSIONE</u>	41
--------------------	----

b. <u>Analisi di associazione dello SNP rs2228570 del gene VDR con il DT2 in una coorte caso-controllo</u>	43
--	----

#### MATERIALI E METODI

Popolazione	43
Esame clinico e indagini ematochimiche	43
Indici di insulino-resistenza e insulino-secrezione	44
Genetica	44
Statistica	44

<u>RISULTATI</u>	45
------------------	----

<u>DISCUSSIONE</u>	47
--------------------	----

c. <u>Analisi di SNPs coinvolti nel metabolismo della vitamina D, individuati attraverso GWAS, in un'ampia coorte di pazienti con DT2</u>	49
---	----

## MATERIALI E METODI

Popolazione	49
Esame clinico e indagini ematochimiche	50
Genetica	51
Statistica	52

## RISULTATI

DHCR7 rs12785878	53
CYP2R1 rs10741657	56
GC rs4588	58
VDR rs11568820	60
Genetic Risk Score (GRS)	61

<u>DISCUSSIONE</u>	65
--------------------	----

<u>PROSPETTIVE FUTURE</u>	67
---------------------------	----

## 2) OBIETTIVI SECONDARI

a. <u>Analisi dello SNP rs778114184 del gene APOA5 in una popolazione di 924 bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi Sardi</u>	69
--	----

<u>INTRODUZIONE</u>	69
---------------------	----

<u>MATERIALI E METODI</u>	
Popolazione	70
Esame clinico e indagini ematochimiche	70
Indici di insulino-resistenza e insulino-secrezione	71
Genetica	71
Statistica	71
<u>RISULTATI</u>	72
<u>DISCUSSIONE</u>	75
b. <u>Resequencing del gene APLN e successiva genotipizzazione di 2 SNPs (rs181301686 e rs2281069 del gene APLN)</u>	78
<u>INTRODUZIONE</u>	78
<u>MATERIALI E METODI</u>	
Popolazione I	79
Popolazione II	79
Sequenziamento del gene	79
Genetica	80
Statistica	80
<u>RISULTATI</u>	
Step 1: screening di varianti del gene APLN	80
Step 2: genotipizzazione delle varianti rs181301686 e rs2281069	81
<u>DISCUSSIONE</u>	83

### 3) STUDI AGGIUNTIVI

- i) Effetti della supplementazione orale con alte dosi di vitamina D  
in pazienti diabetici con NAFLD: studio monocentrico, randomizzato,  
in doppio cieco contro placebo 85
- ii) Eterogeneità fenotipica associata alla disfunzione del tessuto  
adiposo in pazienti con diabete di tipo 2 87
- iii) Livelli aumentati di interleuchina 8 sono associati a segni di  
disfunzione del tessuto adiposo e a un peggiore profilo di rischio  
in pazienti con diabete di tipo 2 89

### BIBLIOGRAFIA 90

### PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE SU RIVISTE INTERNAZIONALI DERIVANTI DAL PROGETTO DI DOTTORATO 118

### ABSTRACTS (comunicazioni orali e/o poster con discussione) DERIVANTI DAL PROGETTO DI DOTTORATO 121

## INTRODUZIONE GENERALE

Il Diabete di tipo 2 (DT2) è una malattia caratterizzata da un'inadeguata risposta delle beta-cellule alla progressiva resistenza insulinica che si accompagna, con l'avanzare dell'età, a inattività e ad aumento di peso (Stumvoll M 2008).

Il DT2 è un disturbo metabolico complesso causato dall'interazione di fattori genetici e ambientali, e si ritiene che il contributo genetico sia di circa il 50-70%; ad oggi sono stati individuati più di 80 geni legati al DT2, e questi geni presentano spesso polimorfismi che modificano la loro funzione (Talmud PJ 2010; Li H 2013; Wang CJ 2013).

Studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno identificato una lunga lista di geni che sono moderatamente associati a una predisposizione al DT2, molti dei quali coinvolti nella funzionalità delle cellule beta pancreatiche. Tuttavia, nessuna di queste associazioni genetiche è sufficientemente forte da poter essere utilizzata per lo screening pre-diagnostico. Attualmente, il miglior predittore del rischio rimane una storia familiare positiva (Muscogiuri G 2014).

La prevalenza sempre più diffusa del DT2 è legata all'aumento del tasso di obesità (Zimmet P 2001), che è una conseguenza delle tendenze sociali verso una maggiore assunzione di energia e una riduzione delle spese energetiche.

Il tasso di mortalità nei pazienti diabetici è circa il doppio di quello dei soggetti non diabetici di età simile (Rao Kondapally Seshasai S 2011); questo rende il diabete un fattore di rischio per la mortalità, in particolare di origine cardiovascolare (CV), che determina 2,9 milioni di eventi globali annuali (Roglic G 2005).

Tale scenario si prevede in ulteriore peggioramento dato che la prevalenza del DT2, di gran lunga la forma più comune di diabete che comprende oltre il 90% di tutti i soggetti diabetici, è in aumento in tutto il mondo (International Diabetes Federation). L'alta, e sempre in ulteriore crescita, prevalenza del DT2 rappresenta un'enorme sfida per i sistemi di assistenza sanitaria e di finanziamento mondiali. Pertanto, è necessaria una precoce identificazione degli eventi cardiovascolari nei pazienti diabetici, al fine di indirizzare le strategie di prevenzione.

E' riconosciuto un contributo genetico nelle diverse forme di diabete ad esordio precoce (più noto come diabete monogenico) e in quelle ad insorgenza in età adulta (Stumvoll M 2008).

Attraverso diversi approcci genetici, come studi di associazione e studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) e combinati con studi di meta-analisi, si è dimostrato che queste diverse forme di diabete sono caratterizzate da una grande eterogeneità genetica, mettendo in evidenza la complessità delle vie di segnale che sono fondamentali per la biologia delle cellule beta pancreatiche (Florez JC 2008; Frayling T 2007; Zeggini E 2007).

Il numero di loci per i quali esistono prove convincenti che conferiscono suscettibilità al DT2 hanno cominciato a crescere all'inizio del 2007 con la pubblicazione dei primi studi GWAS (Sladek R 2007; Frayling T 2007; Scott LJ 2007; Zeggini E 2007) e si è ampliata notevolmente negli anni successivi.

Ad oggi, studi di meta-analisi e di GWAS sul DT2 che includono soggetti di origine europea, asiatica, africana e americana hanno identificato oltre 80 loci di suscettibilità (Gaulton KJ 2015; DIAGRAM Consortium 2014; Lyssenko V 2013; Dupuis J 2010; Voight BF 2010; Zeggini E 2008).

Nonostante il grande successo degli studi GWAS che hanno condotto alla scoperta degli SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) associati al DT2, il meccanismo attraverso il quale questi SNPs fisiologicamente influenzino la patogenesi del DT2 non è ancora del tutto chiaro. I geni di suscettibilità per il DT2 identificati finora sono principalmente associati alla maturazione o alla funzione delle beta-cellule del pancreas: le varianti di rischio potrebbero alterare la secrezione insulinica stimolata dal glucosio, la conversione della proinsulina, la secrezione o l'azione degli ormoni incretinici.

E' stato recentemente dimostrato che le misurazioni di laboratorio di routine possono essere utilizzate per la creazione di un modello convalidato per la previsione del rischio di mortalità nei pazienti affetti da DT2 (De Cosmo S 2013).

Tuttavia, nonostante la buona performance di questo modello, circa il 25% dei pazienti rimane ancora erroneamente diagnosticato (De Cosmo S 2013).

Esempi simili, se non peggiori, sono stati ottenuti da modelli di previsione riportati in precedenza (Yang X 2008; Wells BJ 2008; McEwen LN 2012), rendendo quindi necessaria la messa a punto di una migliore valutazione del tasso di mortalità e di morbilità cardiovascolare nel paziente diabetico.

Infatti, migliorare la capacità di stratificare il rischio individuale permetterebbe di concentrare l'attenzione in maniera precisa sui pazienti ad alto rischio. Per perseguire questo obiettivo, è certamente necessario individuare nuovi marcatori molecolari e metabolici di mortalità e rischio di malattie cardiovascolari (CVD), che potrebbero eventualmente diventare marcatori di interesse clinico. Inoltre, poter classificare ciascun individuo in modo preciso, permetterebbe di identificare sottogruppi di pazienti che potrebbero trarre beneficio da terapie specifiche in base al loro "fenotipo molecolare e/o metabolico".

Insieme ai classici fattori di rischio per la previsione del rischio di malattie cardiovascolari e di mortalità, sono stati suggeriti nuovi potenziali biomarcatori. Tra questi, i livelli di vitamina D sono considerati un importante fattore di rischio, e devono essere confermati come marker clinico di rischio cardiovascolare.

L'individuazione del Vitamin D Receptor (VDR) e della 1-alfa-idrossilasi nelle cellule di tutto il sistema cardiovascolare ha motivato diversi studi sul ruolo della vitamina D nell'eziologia delle malattie cardiovascolari. Studi sperimentali hanno evidenziato numerose vie che collegano i livelli della vitamina D con l'aterogenesi e con il rischio CVD. La vitamina D sembra essere in grado di interagire con il sistema renina-angiotensina aldosterone (RAAS), l'infiammazione, la coagulazione, la proliferazione delle cellule muscolari lisce delle pareti vascolari e dei cardiomiociti, la calcificazione vascolare e i livelli degli ormoni paratiroidei. Allo stesso tempo, la vitamina D può migliorare la secrezione dell'insulina e la sensibilità all'insulina, nonché la funzione endoteliale (Brandenburg VM 2012; Van der Schueren BJ 2012).

In uno studio trasversale condotto su 715 pazienti diabetici di tipo 2, Zoppini e i suoi collaboratori hanno dimostrato che alti livelli di emoglobina glicata sono associati a bassi livelli di vitamina D nel siero indipendentemente dalla durata del diabete, dal trattamento anti-diabetico e dalla presenza di nefropatia (Zoppini G 2013).

L'ipovitaminosi D è stata associata con un più alto rischio di sindrome metabolica e di DT2 (Scragg R 2004; Ford ES 2005).

Gli studi di popolazione suggeriscono che la vitamina D (e il calcio) potrebbero giocare un ruolo fondamentale nello stimolo della funzione delle cellule beta del pancreas e sulla sensibilità all'insulina, entrambi meccanismi importanti nella patogenesi del DT2.

Un grande studio trasversale (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) ha mostrato una correlazione inversa tra i livelli sierici di 25-idrossi-vitamina D e l'incidenza di DT2 e resistenza insulinica (Scragg R 2004; Ford ES 2005).

Uno studio prospettico (Medical Research Council Ely Study 1990-2000) ha evidenziato una relazione inversa tra 25-idrossi-vitamina D e stato glicemico (Forouhi NG 2007).

Numerose evidenze suggeriscono inoltre che la vitamina D presenta potenziali effetti benefici sui fattori di rischio cardiovascolare e sullo sviluppo di CVD (Michos ED 2008; Holick MF 2007).

Studi di popolazione hanno mostrato che bassi livelli di vitamina D circolante si associano alla presenza di fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari, in particolare ipertensione, alterata tolleranza al glucosio e infiammazione (Forman JP 2007; Mattila C 2007; Martins D 2007; Shea MK 2008).

Studi trasversali e caso-controllo hanno mostrato livelli ridotti o insufficienti di 25-idrossi-vitamina D nei pazienti con malattia cardiovascolare conclamata (Poole KE 2006; Melamed ML 2008) e si è osservata una forte associazione tra bassi livelli di vitamina D e un aumento del rischio cardiovascolare (Holick MF 2007; Mattila C 2007; Melamed ML 2008; Michos ED 2008).

Nonostante i dati promettenti ottenuti dagli studi trasversali e caso-controllo, i risultati degli studi prospettici sull'associazione tra i livelli basali di vitamina D e la successiva incidenza di eventi cardiovascolari sono incompleti. Inoltre, la relazione tra lo stato della vitamina D e gli eventi CVD nei pazienti diabetici di tipo 2 è inesplorato, poiché tutti gli studi sono stati condotti nella popolazione generale.

## VITAMINA D

### Introduzione

Gran parte dei livelli di vitamina D (misurata attraverso la 25-idrossivitamina D, 25(OH)D) sono determinati dalla stagione e da altri fattori modificabili che influenzano sia la sua sintesi sulla pelle che l'assunzione dietetica. Tuttavia, la ricerca delle influenze genetiche sullo stato della vitamina D è attiva da diversi anni. Si ritiene infatti che la componente ereditaria della concentrazione di 25(OH)D sia considerevole; tuttavia, vi è un'ampia variabilità dei tassi stimati (da 29 a 80%) (Shea MK 2009; Hunter D 2001; Wjst M 2007). Nel 2010 è stato pubblicato il primo grande studio GWAS sulla 25(OH)D il quale, insieme a studi sui geni candidati, ha fornito importanti riflessioni sull'influenza delle varianti genetiche comuni sullo stato della vitamina D, (Wang TJ 2010). Questo studio ha mostrato che mutazioni nei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo (DHCR7), nell'idrossilazione (CYP2R1) e nel trasporto della vitamina D (GC) influenzano i livelli della vitamina D. Varianti in questi loci identificano individui di origine europea a elevato il rischio di ipovitaminosi D.

### Determinanti dello stato di vitamina D: assunzione e metabolismo

La 1,25 diidrossi-vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) è il principale ormone steroideo coinvolto nella regolazione dell'omeostasi minerale e nel metabolismo osseo.

Alle funzioni già note di questa molecola si sono aggiunte negli ultimi anni diverse evidenze sperimentali che dimostrano un'influenza diretta della vitamina D in altre vie metaboliche, nella regolazione del ciclo cellulare e del sistema immunitario.

La vitamina D comprende un gruppo di pro-ormoni liposolubili costituito da 5 diverse vitamine: vitamina D1, D2, D3, D4 e D5.

Le due più importanti forme in cui la vitamina D si può trovare sono la vitamina D2 (ergocalciferolo) e la vitamina D3 (colecalfiferolo), dall'attività biologica molto simile. Il colecalfiferolo (D3) deriva dal colesterolo ed è sintetizzato negli organismi animali, mentre l'ergocalciferolo (D2) è di provenienza vegetale (Dusso AS 2005).

Nell'uomo, la forma naturale della Vitamina D è il colecalfiferolo e viene ingerito attraverso la dieta oppure viene prodotto sulla pelle attraverso l'interazione dei raggi ultravioletti della luce con un derivato del colesterolo (Haddad JG 1974). La vitamina D2 o ergocalciferolo è un

derivato degli steroli vegetali ed è contenuto nella maggior parte degli integratori a base di Vitamina D (Triunfo S 2016; Thorne-Lyman A 2012). Sia la vitamina D2 che la vitamina D3 circolano nel sangue legate alla proteina legante la Vitamina D e devono essere idrossilate per diventare attive. Si pensa che i metaboliti D3 e D2 abbiano un'attività fisiologica simile, ma i livelli di D3 possono aumentare più rapidamente dopo supplementazione (Triunfo S 2016; Haddad JG 1974). Inoltre, alcuni studi hanno suggerito che la biodisponibilità della vitamina D3 è migliore rispetto a quella della vitamina D2 (Trang HM 1998; Armas LA 2004); in ogni caso, il metabolismo di queste due forme è simile e spesso in letteratura non si fa distinzione parlando per semplicità di vitamina D.

La vitamina D, una volta trasformata nella sua forma attiva, agisce come un ormone in grado di esercitare un controllo su numerose funzioni del nostro organismo.

La vitamina D è una sostanza essenziale per il nostro organismo il cui fabbisogno viene soddisfatto grazie a un'adeguata esposizione alla luce solare e all'alimentazione (20% circa): alcuni alimenti come gli oli di pesce, le uova, il burro, il latte, il fegato e alcuni pesci marini come l'aringa, il salmone e le sardine, contengono buone concentrazioni di questa sostanza e, in stati carenziali o di aumentato fabbisogno, sono indicati supplementi farmacologici.

La vitamina D si forma principalmente sulla pelle attraverso la sintesi stimolata dai raggi ultravioletti con l'esposizione alla luce solare (Webb AR 2006), mentre una quota più piccola dipende dall'introito alimentare (Holick MF 2007; Pilz S 2009).

Il sole è la fonte principale di vitamina D: questa viene, infatti, sintetizzata sulla superficie cutanea mediante una reazione foto-mediata a partire dal 7-deidro-colesterolo presente sulle superfici cellulari.

Le radiazioni in grado di determinare la sintesi della vitamina D sono quelle appartenenti allo spettro solare degli ultravioletti con lunghezza d'onda compresa tra i 290 ed i 315 nanometri, ovvero gli UVB; tra l'autunno e la primavera, invece, l'intensità delle radiazioni solari si riduce, non garantendo, pertanto, il raggiungimento del fabbisogno totale di vitamina D.

Visto l'importante ruolo della luce solare sulla sintesi che avviene sulla pelle, è stato dimostrato un forte impatto della stagione sui livelli di vitamina D, con più alte concentrazioni alla fine dell'estate e più basse in inverno e all'inizio della primavera (Hypponen E 2007; Pilz S 2011; Berry D 2011).

I livelli di vitamina D sono influenzati dalla latitudine, dalla durata delle stagioni e dal clima (Holick MF 2007). Ci sono differenze in base all'etnia e la sintesi della vitamina D più efficiente nei soggetti con la pelle più chiara si ritiene sia un risultato dell'adattamento dovuto alla migrazione verso climi più freddi e meno soleggiati durante l'evoluzione (Looker AC 2002; Jablonski NG 2010). L'assunzione dietetica e la supplementazione spiegano l'1-8% della variazione inter-individuale dei livelli di 25(OH)D, mentre la stagione e l'esposizione alla luce del sole spiegano tra l'1 e il 15% (Burgaz A 2007; Shea MK 2009; Millen AE 2010; Sinotte M 2009).

I raggi UVB del sole stimolano la sintesi della vitamina D attraverso la conversione del 7 deidro-colesterolo sulla pelle in vitamina D<sub>3</sub> (Horst R 2005). La maggiorparte della vitamina D ottenuta dalla sintesi sulla pelle e introdotta con la dieta viene trasportata nel fegato dove viene idrossilata a 25(OH)D, anche se una minor quota di idrossilazione avviene anche in sede extra-epatica (DeLuca HF 2008; Pilz S 2011).

L'idrossilazione della vitamina D in 25(OH)D viene finemente regolata nel fegato (Horst R 2005); tale metabolita risulta molto stabile e pertanto è più comunemente usato per misurare lo stato di Vitamina D.

Un ulteriore idrossilazione della 25(OH)D avviene principalmente nel rene (e in misura minore in altri tessuti) con un processo strettamente regolato dai livelli di calcio, di fosforo e di ormone paratiroideo, conducendo alla forma attiva, la 1,25 di-idrossi vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D, calcitriolo) (Horst R 2005) che ha un'alta affinità per il suo recettore VDR (Baz-Hecht M 2010).

I livelli circolanti di 1,25(OH)<sub>2</sub>D sono strettamente regolati e la sua emivita è solo di circa 10-20 ore (Jones G 2008). Invece l'emivita della 25(OH)D è di circa 15 giorni ed è per questo motivo che si preferisce utilizzare questo metabolita per la determinazione dei livelli circolanti (Horst R 2005). La concentrazione del siero di 25(OH)D è considerato il migliore indicatore dello stato della vitamina D e ne riflette la produzione totale (Pilz S 2011; Holick MF 2007).

In circolo entrambi i metaboliti (25(OH)D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D) vengono trasportati dalla proteina legante la vitamina D (GC o DBP) (Speeckaert M 2006; Daiger SP 1975). La proteina legante la vitamina D è importante non solo per il trasporto in circolo, ma anche per l'assorbimento di 25(OH)D e di 1,25(OH)<sub>2</sub>D nelle cellule bersaglio (Pilz S 2011).

Dopo la seconda idrossilazione, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D si lega al Vitamin D Receptor (VDR). Le azioni biologiche della vitamina D vengono espletate attraverso il legame della 1,25(OH)<sub>2</sub>D allo

specifico recettore VDR, presente in un vasto numero di tessuti e cellule umane, tra cui adipi, fegato, muscolo, cellule dendritiche e linfociti T (Mitri J 2011).

Per evitare l'eccessiva attivit  della vitamina D negli organi bersaglio, attraverso un meccanismo di feedback negativo, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D attiva l'enzima vitamina D 24-idrossilasi (CYP24A1) che converte la 1,25(OH)<sub>2</sub>D nella forma inattiva idrosolubile che viene escretata con la bile (Holick MF 2007; Carter GD 2011; Dastani Z 2013; DeLuca HF 2008). (Figura 1)

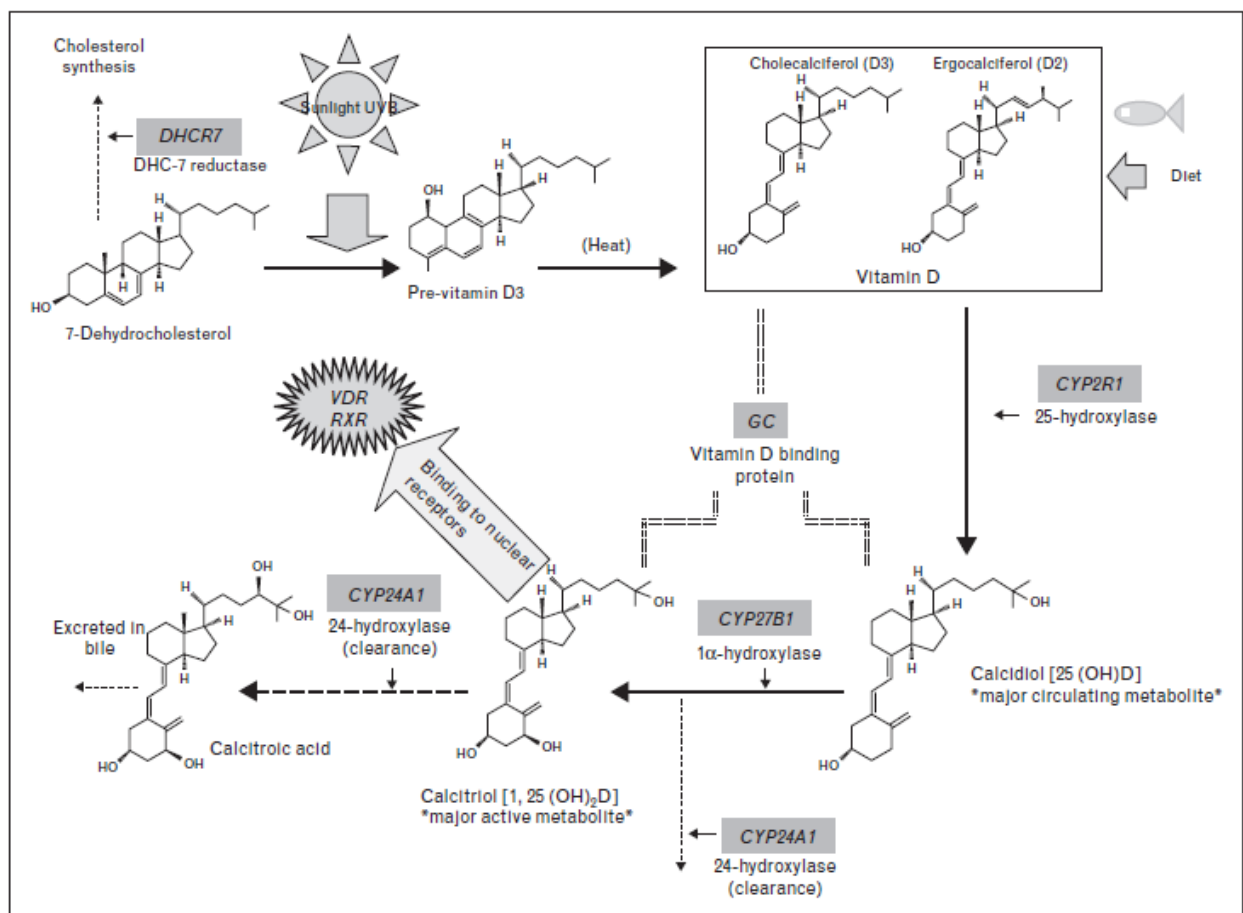


Figura 1. Metabolismo della vitamina D. (Berry D 2011)

## **Ipovitaminosi D**

La condizione di ipovitaminosi D, che rappresenta attualmente una pandemia nei paesi occidentali, si associa a un'aumentata prevalenza ed incidenza di sindrome metabolica e di DT2. Le principali cause di carenza vitaminica D sono una scarsa esposizione alla luce solare, un declino nella sintesi cutanea, una scorretta alimentazione e una ridotta idrossilazione renale (Holick MF 2007). Valori al di sotto di 20 ng/ml (50 nmol/l) sono considerati indicativi di uno stato di insufficienza mentre valori compresi tra 20 e 30 ng/ml (50-75 nmol/l) sono espressione di una condizione di carenza (Holick MF 2007; Holick MF 2009). Buoni livelli di vitamina D riducono il rischio di diabete: diversi studi prospettici suggeriscono che il deficit di vitamina D si associa al rischio di sviluppare il DT2, ma la maggior parte di questi studi non ha valutato l'apporto alimentare di calcio che può avere un effetto indipendente o sinergico con la vitamina D nel ridurre il rischio di DT2 (Mitri J 2011).

Oltre al ruolo nel metabolismo dell'osso, visto il ruolo pleiotropico della vitamina D (Nagpal S 2005), si ritiene che la sua carenza predisponga anche allo sviluppo di altre patologie quali infezioni respiratorie, malattie autoimmuni, malattie cardiovascolari, diabete e cancro (Holick MF 2008).

L'ipovitaminosi D conduce a osteoporosi dovuta ad un aumento del riassorbimento osseo causato dall'incremento delle concentrazioni sieriche di paratormone (Holick 2007). Inoltre, la carenza di vitamina D è associata ad affaticabilità muscolare, all'osteomalacia, alla ricketsia nei bambini e alle fratture ossee (Lips P 2011; Bouillon R, 2008).

Mantenere uno stato vitaminico adeguato è importante, non solo per la salute ossea, ma anche perché la carenza di vitamina D è associata ad altri outcomes extra-scheletrici, tra cui il tumore del seno, del colon e della prostata (Martinez ME 1996; Garland CF 1989; John EM 1999), la risposta immunitaria, il diabete di tipo 1, di tipo 2 e la sindrome metabolica (Bouillon R 2008; Hypponen E 2001; Zipitis CS 2008), le malattie cardiovascolari e l'ipertensione (Wang TJ 2008; Giovannucci E, 2008), le funzioni neuropsicologiche e la mortalità per tutte le cause. (Holick MF 2011; Bikle DD 2011; Davis CD 2011; Grant WB 2011; Scragg R 2011; Hewison M 2011; Institute of Medicine, 2011; Borradale D 2009). Quindi, livelli adeguati di vitamina D, conducono anche ad una riduzione del rischio di diverse malattie (Grant 2011).

Una metanalisi ha suggerito che la supplementazione di vitamina D porta a una riduzione della mortalità (Autier P 2007).

L'ipovitaminosi D è stata associata al DT2 e alle malattie cardiovascolari (CVD) nonché ai fattori di rischio cardiovascolari (Forouhi NG 2012; Grandi NC 2010; Baz-Hecht M 2010).

Risultati ottenuti da studi prospettici longitudinali hanno mostrato che bassi livelli circolanti di 25(OH)D sono associati ad un aumento del rischio di sviluppare DT2. In una recente e grande meta-analisi che comprendeva 22 studi prospettici, Ye e i suoi collaboratori hanno confermato che le concentrazioni più basse di vitamina D conferiscono un rischio aumentato di DT2 in soggetti di origine europea (Ye Z 2015).

Non è ancora chiaro se questa associazione sia o meno causale, dato che potrebbe essere influenzata dalla presenza di fattori confondenti come l'esposizione alla luce solare, la supplementazione e l'alimentazione (Rosen CJ 2012, Forouhi NG 2012). Studi sui polimorfismi che influenzano i livelli circolanti della vitamina D potrebbero chiarire tale incertezza (Wang TJ 2010).

L'inadeguata esposizione alla luce solare, la dieta e i fattori genetici, come polimorfismi dei geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D (tra cui DHCR7, CYP2R1 e GC) sono associati a ipovitaminosi D (Wang TJ, 2010).

Sebbene le variazioni nei geni coinvolti nel segnale e nel metabolismo della vitamina D non siano generalmente associate al DT2, molti studi hanno evidenziato che bassi livelli di vitamina D circolanti possono essere un fattore di rischio e forse un possibile bersaglio terapeutico a causa delle proprietà anti-infiammatorie e pro-differenziazione di questo ormone steroideo (Muscogiuri G 2014).

### **Diabete e vitamina D**

Diversi studi hanno mostrato che l'ipovitaminosi D è associata al DT2 (Forouhi NG 2012; Baz-Hecht M 2010). L'ipovitaminosi D si associa a una aumentata prevalenza ed incidenza di sindrome metabolica e di DT2 (Palomer X 2008; Lui E 2010). Inoltre, sia mediante studi trasversali che caso-controllo nella popolazione generale, è stata dimostrata una forte associazione tra bassi livelli di vitamina D e aumento del rischio cardiovascolare (Holick MF, 2007; Mattila C, 2007; Melamed ML, 2008; Michos ED, 2008). In una grande metanalisi che comprendeva 22 studi prospettici Ye e collaboratori (Ye Z 2015) hanno confermato che bassi livelli di vitamina D conferiscono un rischio aumentato di DT2 nelle popolazioni di origine europea. Tuttavia, se i bassi livelli di vitamina D siano causali o una conseguenza della malattia metabolica è ancora da chiarire.

Numerose evidenze epidemiologiche suggeriscono un'associazione tra deficit vitaminico D, intolleranza glicemica e patologia diabetica verosimilmente legata sia a meccanismi diretti (mediati dal Recettore della vitamina D a livello delle cellule pancreatiche) e indiretti (legati alla riduzione dei livelli di calcio e/o dagli effetti sulle cellule del sistema immunitario). In particolare una correlazione inversa tra livelli circolanti di 25(OH)D e prevalenza del DT2 è stata descritta in ampie casistiche come quelle del "European Prospective investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk study", del "National Health and Nutrition examination Survey (NHANES)" e del "Medical Research Council Ely Study" (Scragg R 2004; Forouhi NG 2007; Forouhi NG 2012), così come in recenti meta-analisi dei principali studi osservazionali (Pittas AG 2007; Song Y 2013; Khan H 2013). In molti di questi studi una riduzione dei livelli di 25(OH)D è stata anche associata ad incrementi della glicemia, insulino-resistenza e disfunzione beta cellulare (Mezza T 2012; Van Belle TL 2013). Analogamente, esistono chiare correlazioni tra stato di carenza vitaminica D e diabete gestazionale (Aghajafari F 2013), condizione che rappresenta un importante fattore di predisposizione per il successivo sviluppo di DT2.

Nonostante la maggior parte delle evidenze epidemiologiche sembri confermare la relazione tra ipovitaminosi D e rischio di DT2, tale correlazione non è sempre univoca e sembra essere almeno in parte condizionata dal peso corporeo (Grimnes G 2010; Vimalaswaran KS 2013), visto che i livelli di 25(OH)D sono più frequentemente ridotti nei soggetti obesi e che buona parte dei pazienti con DT2 presenta un incremento di peso. Tale evidenza spiegherebbe anche la frequente associazione tra carenza vitaminica D e sindrome metabolica (Wimalawansa SJ 2016). Parallelamente alle evidenze epidemiologiche, numerosi studi su modelli cellulari e animali suggeriscono un ruolo protettivo della vitamina D sulla beta cellula con effetti antagonisti su molti dei meccanismi patogenetici alla base dell'insorgenza del DT2.

In particolare, in corso di infusione con glucosio e arginina, il pancreas di ratti con deficit di vitamina D manifesta una ridotta secrezione insulinica che può essere normalizzata con il ripristino di normali livelli di vitamina D (Norman AW 1980). Successivamente, altre osservazioni sperimentali hanno dimostrato che la terapia con vitamina D migliora il compenso glicemico in modelli murini di DT2 (De Souza Santos R 2005).

Il ruolo della vitamina D nella patogenesi del DT2 rimane però controverso e complesso (Mathieu C 2015; Jorde R 2015) e sono necessari ulteriori studi randomizzati appositamente studiati per valutare gli effetti della vitamina D sul pre-diabete e sul diabete. Le evidenze recenti provenienti dai trials non mostrano alcun effetto della supplementazione della vitamina

D sull'omeostasi del glucosio o sulla prevenzione del diabete (Seida JC 2014), anche se nella maggior parte dei casi il periodo di trattamento era troppo breve, e possono aver influito fattori confondenti come la compliance del paziente, l'assunzione combinata di calcio e le dosi di supplementazione della vitamina D. Tuttavia, le prove a sostegno di un ruolo della vitamina D nel DT2 deriva da studi osservazionali trasversali e longitudinali in diverse coorti che dimostrano che esiste un'associazione inversa tra lo stato della vitamina D e il rischio di DT2 e di iperglicemia (Muscogiuri G 2012; Alvarez JA 2010; Hypponen E 2008; Grimnes G 2010; Gagnon C 2011). Questi risultati sollevano domande sullo stadio della patogenesi in cui sarebbe più utile affrontare la carenza di vitamina D. Uno studio di intervento sulla supplementazione di vitamina D con l'aggiunta del calcio ha evidenziato un miglioramento della sensibilità all'insulina nei pazienti con pre-diabete dopo 6 mesi di trattamento (Gagnon C 2014). Questa constatazione suggerisce che l'integrazione della vitamina D potrebbe essere più efficace in soggetti a rischio di DT2 che non hanno ancora sviluppato la patologia.

Sono necessari ulteriori studi per valutare in modo più preciso l'associazione tra le concentrazioni di 25(OH)D e il rischio di DT2. Se la causalità esiste, gli interventi come l'aumento dell'esposizione alla luce solare o dell'assunzione di vitamina D attraverso la dieta o con la supplementazione potrebbero fornire una strategia di prevenzione semplice, poco costosa e sicura per il DT2. In attesa di più precise informazioni è raccomandabile che i pazienti diabetici e i soggetti a maggior rischio di sviluppare DT2 mantengano un adeguato apporto di vitamina D.

### **Determinanti dello stato di vitamina D: focus sulle varianti genetiche**

Studi di associazione sull'intero genoma hanno identificato SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) all'interno di geni correlati alla concentrazione di vitamina D: DHCR7 che codifica per l'enzima 7 deidro-colesterolo reduttasi, coinvolto nella sintesi della 25(OH)D sulla pelle e responsabile della trasformazione da 7 deidro-colesterolo a colesterolo; CYP2R1 che è un membro della famiglia dei citocromi P450 e che codifica per l'enzima vitamina D 25-idrossilasi, coinvolto nella idrossilazione epatica della vitamina D; DBP/GC che codifica per la proteina legante la vitamina D, coinvolto nel trasporto della vitamina D; VDR che codifica per il recettore specifico che lega la vitamina D nei tessuti bersaglio (Jorde R 2012; Buijsse B 2013; Wang TJ 2010; Ahn J 2010).

Gli SNPs dei geni DHCR7, CYP2R1, GC sono stati trovati associati allo stato di vitamina D in studi di GWAS e di associazione genetica (Dastani Z 2013; McGrath JJ 2010; Ahn J 2010; Wang TJ 2010).

E' stato dimostrato che i geni che codificano per gli enzimi 7-deidro-colesterolo reductasi (DHCR7), vitamina D 25-idrossilasi (CYP2R1) e vitamina D-binding protein (DBP/GC) sono i principali loci che controllano la variabilità ereditaria dei livelli circolanti di vitamina D (Wang TJ 2010).

Oltre all'importanza della dieta e dell'esposizione alla luce solare, diversi studi hanno mostrato che i fattori genetici influenzano i livelli di vitamina D in maniera apprezzabile (Engelman CD 2008; Shea MK 2009; Karohl C 2010). Si stima che il contributo genetico sui livelli di 25(OH)D vari dal 23 a 77% (Shea MK 2009; Engelman CD 2008; Hunter D 2001; Orton SM 2008; Arguelles LM 2009; Karohl C 2010; Snellman G 2009). Risultati ottenuti da studi su famiglie indicano che le concentrazioni di vitamina D sono, almeno in parte, sotto il controllo genetico (Shea MK 2009; Engelman CD 2008; Hunter D 2001; Orton SM 2008; Arguelles LM 2009; Karohl C 2010; Snellman G 2009). Recenti evidenze indicano però che le stime possono essere influenzate dalla stagione (Karohl C 2010; Snellman G 2009; Wjst M 2006) che influenza la quantità di vitamina D prodotta per effetto dell'esposizione alla luce solare. Inoltre, sono state descritte differenze di concentrazione anche in base all'etnia (Signorello LB 2011).

Due studi di GWAS e diversi studi su geni candidati hanno evidenziato SNPs in grado di influenzare le concentrazioni di 25(OH)D (Engelman CD 2008; Sinotte M 2009; Ahn J 2010; Monticelo OA 2012; Engelman CD 2013; Nissen J 2014). Questi SNPs sono localizzati sui geni che codificano per prodotti responsabili della sintesi, attivazione, trasporto o degradazione della vitamina D. Questi risultati indicano che le concentrazioni di 25(OH)D non dipendono quindi soltanto dall'alimentazione e dall'esposizione solare, ma anche dai fattori genetici. Quindi i fattori genetici possono aiutare a identificare gli individui a rischio di ipovitaminosi D.

Allo stato attuale, gli strumenti comunemente in uso per la comprensione del rischio individuale di sviluppare molte delle malattie non infettive si basano su elementi e misure di tipo clinico-demografico. Tuttavia, tali marcatori sono soggetti a modificazioni durante l'arco della vita e pertanto sono relativamente poco efficaci per una diagnosi precoce. Al contrario, l'informazione genetica contenuta nel nostro DNA rimane immutata nel corso della vita e pertanto i marcatori genetici rappresentano i candidati ideali per predire precocemente il

rischio individuale di malattia, in alcuni casi con alcune decadi di anticipo rispetto all'esordio clinico della stessa.

## **GENI COINVOLTI NEL METABOLISMO DELLA VITAMINA D**

### **DHCR7 (7 deidro-colesterolo reduttasi)**

Il gene DHCR7 è costituito da 9 esoni e 8 introni, si trova sul braccio lungo del cromosoma 11 e codifica per l'enzima 7 deidro-colesterolo reduttasi che promuove la trasformazione da 7-deidro-colesterolo a colesterolo. DHCR7 rimuove il pre-colesterolo dalla via della vitamina D riducendo il substrato disponibile per la formazione di 25(OH)D. Mutazioni nel gene portano alla sindrome di Smith-Lemli-Opitz (caratterizzata dalla ridotta attività dell'enzima 7 deidro-colesterolo reduttasi), nella quale la compromessa attività del gene conduce all'accumulo di 7 deidro-colesterolo e alla carenza di colesterolo comportando anomalie congenite e disturbi dell'intelletto (Tint GS 1994). Le informazioni sui soggetti affetti dalla sindrome sono limitate, e non si sa se il loro stato vitaminico sia alterato (Rossi M 2005). Comunque, negli studi eseguiti sugli animali, l'inibizione di DHCR7 ha condotto all'aumento di 7 deidro-colesterolo e dei livelli di 25(OH)D (Bonjour JP 1987; Morris JG 1999).

Date le associazioni trovate tra le varianti comuni di DHCR7 e i livelli di vitamina D (Dastani Z 2013; McGrath JJ 2010; Ahn J 2010; Wang TJ 2010), si pensa che l'enzima abbia un ruolo importante nella regolazione dello stato di vitamina D più di quanto si ritenesse in precedenza.

### **CYP2R1 (vitamina D 25 idrossilasi)**

Il gene CYP2R1 è costituito da 5 esoni e 4 introni, è posizionato sul braccio corto del cromosoma 11 e codifica per l'enzima vitamina D 25 idrossilasi; è un membro della famiglia dei citocromi P450, che catalizzano molte reazioni di sintesi del colesterolo, dei lipidi e degli steroidi (Schuster I 2010). Gli studi di GWAS hanno confermato il ruolo di CYP2R1 come enzima principalmente responsabile dell'idrossilazione della vitamina D in 25(OH)D nel fegato. Sono state studiate 4 forme di idrossilasi nel fegato, ma CYP2R1 è quello che ha la maggiore affinità e specificità per la vitamina D (Schuster I 2010). E' stato dimostrato che mutazioni genetiche in CYP2R1 comportano ipovitaminosi D (Cheng JB 2004) e che varianti genetiche in CYP2R1 sono

fortemente associate alle concentrazioni di 25(OH)D (Wjst 2006; Ramos-lopez E 2007; Nissen J 2014).

### **GC/DBP (vitamin D binding protein)**

Il gene GC/DBP è formato da 13 esoni e 12 introni, ed è posizionato sul braccio lungo del cromosoma 4; codifica per la proteina GC, nota anche come proteina DBP, che è una glicoproteina sierica, multifunzionale e polimorfica ed ha una struttura simile a quella dell'albumina (Speeckaert M 2006; Braun A 1993; Vu D 2013; Hirai M 2000).

Esistono sei forme di GC, che differiscono nella composizione aminoacidica e nella glicosilazione (Cleve H 1998). Le varie forme differiscono anche nell'affinità di legame dei metaboliti della vitamina D, influenzando sulle concentrazioni plasmatiche di 25(OH)D e 1,25(OH)2D (Lauridsen AL 2001; Lauridsen AL 2005; Arnaud J 1993; Carpenter TO 2013).

Per la normale funzione della vitamina D nel corpo, la maggior parte della vitamina D e i suoi metaboliti sono legati ad alta affinità nel sangue alla proteina GC (83-85%), una minor quota è legata a bassa affinità all'albumina (12-15%), e la restante parte (meno dell'1%) circola libera (Bikle DD 1986; Haddad JG 1995). GC lega dall'85 al 90% della 25(OH)D totale circolante e l'85% della 1,25(OH)2D totale circolante (Bikle DD 1986; Bikle DD 1985). GC trasporta la 25(OH)D dal fegato al rene e agli altri organi dove viene convertita nella forma più attiva, la 1,25(OH)2D.

I metaboliti della vitamina D legati alla proteina hanno emivita più lunga, e sono meno esposti all'idrossilazione e alla degradazione (Speeckaert M 2006). Questo suggerisce che una funzione importante della proteina GC è quella di mantenere stabili i livelli circolanti di vitamina D e dei suoi metaboliti (Safadi FF 1999). La funzione principale della proteina GC è quindi di stabilizzare e prolungare l'emivita della 25(OH)D e dei suoi metaboliti (Speeckaert 2006). Essendo il trasportatore plasmatico più importante della vitamina D, GC è essenziale per il metabolismo intracellulare della vitamina D (Braun A 1993).

Alterazioni in GC potrebbero influenzare la quantità e l'attività della vitamina D, e quindi alterare la secrezione di insulina, la funzione delle cellule  $\beta$  e il metabolismo del glucosio (Afzal S 2012; Flores M 2005; Chiu KC 2004). Diversi studi su geni candidati hanno mostrato associazioni tra le varianti di GC e le concentrazioni di 25(OH)D (Lauridsen AL 2005; Kurylowicz A 2006; Abbas S 2008; Engelman CD 2008; Sinotte M 2009; Gozdzik A 2011; Nissen J 2014).

## **VDR (Vitamin D Receptor)**

Il gene VDR è formato da 11 esoni e 10 introni; è situato sul braccio lungo del cromosoma 12 e codifica per il recettore che legando la vitamina D, media le sue azioni. Perciò molti studi genetici sono stati focalizzati sul gene del VDR.

La vitamina D agisce a livello molecolare attraverso il legame al VDR, che è un membro della famiglia dei recettori nucleari della famiglia dei regolatori trascrizionali (Evans RM 1998). Il VDR regola positivamente o negativamente la trascrizione genica attraverso il legame agli elementi responsivi alla vitamina D (VDREs e nVDREs rispettivamente) situati nella regione promoter dei geni target (Chen K 1995; Clark SA 1980). Il VDR è espresso in diversi tipi di cellule come le cellule beta pancreatiche (Clark SA 1980), le cellule muscolari lisce delle pareti vascolari (Mitsuhashi T 1991), gli osteoblasti, i condrociti (St-Arnaud R 2008), le cellule del fegato (Nimitphong H 2012), le cellule del tessuto adiposo (Nimitphong H 2012), le cellule muscolari (Simpson RU 1985), le cellule dendritiche (Veldman CM 2000) e i linfociti (Veldman CM 2000).

Il VDR è un fattore di trascrizione, i cui prodotti sono coinvolti in una vasta gamma di attività, tra cui il metabolismo osseo, la crescita e la differenziazione cellulare, il metabolismo del glucosio e la funzione immunitaria. Sia l'enzima responsabile dell'attivazione della vitamina D ( $1\alpha$ -idrossilasi) sia il suo recettore sono stati individuati nei tessuti periferici, come la placenta, suggerendo un ruolo della vitamina D più ampio rispetto al solo metabolismo osseo (Mulligan ML 2010).

In particolare, il VDR è espresso in concentrazione significativa nei linfociti T e nei macrofagi dove la vitamina D agisce come immunomodulatore selettivo; modelli animali e studi clinici su popolazioni affette da patologie autoimmuni hanno dimostrato che elevati livelli sierici di 25(OH)D riducono il grado di attività della malattia (Pozzilli P 2005).

Inoltre il VDR regola l'espressione di geni coinvolti in diverse funzioni biologiche, come la crescita cellulare, il controllo del ciclo cellulare, l'omeostasi del calcio e del fosforo nel metabolismo osseo.

La presenza di VDR sulla cellula beta pancreatica è stata ampiamente dimostrata, in maniera selettiva e specifica, e in questa sede la vitamina D faciliterebbe la secrezione insulinica indotta dall'iperglicemia, sia direttamente che attraverso la regolazione della concentrazione intracellulare di calcio, senza influenzare l'insulinemia basale (Palomer X 2008). La vitamina D, inoltre, migliorerebbe la sensibilità insulinica inducendo l'espressione muscolare del recettore GLUT-4 e attiverebbe direttamente il fattore trascrizionale PPAR- $\delta$ , implicato nella regolazione

del metabolismo degli acidi grassi liberi nel muscolo e nel tessuto adiposo, grazie alla vasta espressione del VDR in questi tessuti. La vitamina D ed il suo recettore hanno un ruolo importante nella regolazione della secrezione insulinica; è noto infatti che la 1,25(OH)<sub>2</sub>D agisce sia sulla funzione esocrina che endocrina del pancreas (Hausler MR 1997). Diversi studi hanno dimostrato che la vitamina D e il suo metabolita attivo intervengono nella regolazione della secrezione insulinica, non solo modulando i livelli di calcio plasmatico ma anche agendo direttamente sulla beta-cellula (Uitterlinden AG 2004).

La regolazione dell'espressione del VDR gioca un ruolo cruciale nel determinare la risposta delle cellule bersaglio alla 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Mathieu C 2005). E' stato dimostrato anche che il VDR gioca un ruolo importante nelle malattie cardiovascolari, nel cancro, nelle malattie autoimmuni e nel DT2 (Hausler MR 2013; Prietl B 2013).

### **Polimorfismi del gene VDR**

#### **rs11568820 G>A**

Sono stati in precedenza studiati diversi polimorfismi del gene VDR, come rs2228570 (FokI), rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI) e rs731236 (TaqI). Alcuni di questi polimorfismi sono stati trovati associati con un aumento della suscettibilità al DT2 in etnie differenti, ma l'evidenza di tale associazione tra le diverse popolazioni non è costante (Malecki MT 2003; Oh JY 2002).

I polimorfismi rs1544410, rs7975232 e rs731236 non sono funzionali e non determinano un cambiamento nella sequenza amminoacidica (Panierakis C 2009). Yamamoto e i suoi collaboratori (Yamamoto H 1999) hanno descritto un sito di legame funzionale per il fattore di trascrizione specifico intestinale Cdx2 nella regione promoter del gene VDR. Arai e collaboratori hanno dimostrato che lo SNP rs11568820 G>A si trova nella regione promoter del gene e che la sostituzione nucleotidica modula la trascrizione del gene VDR; in particolare l'allele A comporta un incremento della trascrizione del gene VDR rispetto all'allele G (Arai H 2001).

In due studi, effettuati l'uno su soggetti Giapponesi e l'altro su Caucasic, è stato osservato che il polimorfismo rs11568820 modula la densità minerale ossea nelle donne giapponesi in post-menopausa, e che l'allele A del polimorfismo mostra un effetto protettivo sul rischio di fratture (Arai H 2001; Fang Y 2003). Questi dati confermano il ruolo funzionale del polimorfismo rs11568820 del gene VDR.

### **rs2228570 C>T**

Lo SNP rs2228570 è stato studiato per la prima volta negli anni novanta, si trova sul secondo esone, e consiste nella sostituzione C>T (Gross C 1996; Saijo T 1991). La sostituzione avviene nel codone di inizio (ATG) per cui si forma un sito di inizio diverso che conduce alla formazione di una proteina di misura differente. La maggior parte degli esperimenti funzionali condotti finora, effettuati sulle cellule COS7 e HeLa, hanno mostrato che la forma più corta della proteina (424 aa) è più attiva della forma più lunga (427 aa) (Uitterlinden AG 2004). E' importante notare inoltre che lo SNP rs2228570 non si trova in linkage disequilibrium (LD) con gli altri polimorfismi del VDR (Uitterlinden AG 2004).

Una recente metanalisi, che includeva 12 studi comprendenti 2218 casi e 1859 controlli sul polimorfismo rs2228570, ha dimostrato che l'allele T e il genotipo TT erano associati in maniera significativa al DT2 soltanto in popolazioni di origine Cinese (Yu F 2016) mentre non è stata trovata nessuna associazione significativa nelle coorti di diversa etnia (Polonia (Malecki MT 2003), India (Bid HK 2009) e Arabia Saudita (Al-Daghri NM 2012)) comprendenti un totale di 772 casi e 658 controlli (Yu F 2016). Uno studio abbastanza recente ha mostrato che il polimorfismo rs2228570 del gene VDR potrebbe essere un fattore di rischio per il DT2 (Neyestani TR 2013). Studi precedenti, effettuati su 2 piccole coorti di individui di origine Caucasica, hanno riportato un'associazione dello SNP rs2228570 con gli indici di insulino-resistenza e di sensibilità insulinica (Filus A 2008; Chiu KC 2001).

## STUDIO DELLE BASI GENETICHE DELLE MALATTIE

### Aspetti metodologici

La continua evoluzione dello studio delle varianti genetiche associate con le malattie complesse pone continue nuove sfide alla comunità dei ricercatori e dei clinici. L'identificazione delle varianti di suscettibilità delle patologie si ripercuote favorevolmente sia in ambito medico, con il miglioramento della terapia, la valutazione della risposta individuale ai farmaci e la comprensione della risposta adattativa degli organismi agli stimoli ambientali, sia in ambito economico e sociale con una diminuzione dei costi a carico del sistema sanitario.

Di conseguenza, la tecnologia del sequenziamento del DNA, che è alla base della capacità di "leggere" e di interpretare il DNA, è in continua evoluzione. L'avvento delle tecnologie attuali, che hanno rivoluzionato questo processo, hanno permesso l'accelerazione delle ricerche e delle scoperte.

Le prime scoperte si basavano sulla tecnologia nota come metodo di Sanger (Sanger F 1977), considerata la tecnica "gold standard" per lo studio molecolare delle malattie mendeliane e che ha portato alla scoperta di nuovi geni e alla conferma del ruolo causale di altri. Questa tecnologia si basava sull'immissione nella reazione di sequenze di nucleotidi marcati, in modo che la sequenza si arrestasse a livello di ogni base con un nucleotide marcato, emettendo un segnale ad una specifica lunghezza d'onda. Tramite elettroforesi capillare si discriminava la grandezza degli oligonucleotidi e tramite un sistema di eccitazione laser e di rilevazione ottica si identificava il nucleotide in quella posizione. In questo modo si otteneva una sequenza di colori (elettroferogramma) che corrispondeva alle basi della sequenza in esame. Tuttavia questa tecnica permetteva di analizzare un solo segmento di DNA alla volta. Quindi, anche se semplice ed affidabile, richiedeva molto tempo ed era costosa, soprattutto quando il sequenziamento riguardava ampie regioni come l'intero genoma (tutto il materiale genetico di un individuo) o l'esoma (solo le regioni codificanti, ovvero gli esoni dei geni), o grandi quantità di campioni in breve tempo.

Nell'ultimo decennio sono state sviluppate nuove tecnologie e applicazioni in grado di valutare contemporaneamente, a basso costo ed in poco tempo, milioni di SNPs, tramite pannelli contenenti sonde di ibridazione (microarray), e le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) basate sul sequenziamento massivo del DNA amplificato (Mardis ER 2008;

Shendure J 2008). Questo permette di “leggere” tutto il genoma (WGS) o tutto l’esoma (WES) di milioni di soggetti in poche ore (Bamshad MJ 2011; Mamanova L 2010).

Non è quindi sorprendente che la NGS sia stata riconosciuta come un'alternativa efficace ai sequenziamenti di Sanger per studiare la base genetica delle malattie Mendeliane nella ricerca e nell'ambito clinico.

I dati ottenuti sono stati utilizzati per effettuare studi di associazione sull’intero genoma (GWAS), nei quali viene valutato l’effetto di un singolo SNP sul determinare o meno un tratto o una patologia. In seguito, i risultati provenienti dalle ricerche nelle diverse popolazioni sono stati standardizzati e analizzati congiuntamente nelle meta-analisi, così da massimizzare il potere statistico dei dati e la loro capacità di evidenziare associazioni. I primi GWAS si limitavano ai dati provenienti dai microarray, perciò associavano SNPs già noti a tratti o patologie e si concentravano sull’effetto di polimorfismi comuni nella popolazione. Successivamente, il crescente numero di WGS e WES resi disponibili da estesi progetti e consorzi come HapMap, 1000 Genomes ed Exome Aggregation Consortium (ExAC), hanno proposto una mappatura più fine degli SNPs e delle loro associazioni. Inoltre, l’evoluzione informatica è stata fondamentale perché ha reso possibile la fruizione, l’elaborazione e l’analisi dei dati ed è stato necessario lo sviluppo di metodi statistici *ad hoc* per verificare e validare le analisi.

Quindi, mentre i primi approcci genetici prevedevano l’analisi di pochi geni candidati in poche famiglie, oggi i dati disponibili di meta-analisi e GWAS condotti su casistiche sempre crescenti forniscono informazioni sulle regioni o sui geni che sono risultati fortemente associati ad un tratto o a una patologia in una popolazione, e che possono essere poi approfondite sia in famiglie che su altre popolazioni o sotto-popolazioni (Hirschhorn JN 2002).

Dai primi GWAS si ottenevano solamente informazioni sulle varianti comuni. Si pensava, infatti, che tali varianti fossero responsabili della maggior parte dei fenotipi osservabili secondo l’affermazione “variante frequente in malattia frequente” (“common variant in common disease”). In seguito, quando è stato valutato l’effetto di queste varianti comuni sull’ereditarietà specifica per ogni tratto, specialmente in quelli complessi, si è osservato che esse spiegavano solo una parte dell’ereditarietà totale osservata. Si è iniziato così a parlare del paradosso dell’ereditarietà mancante (“missing heritability”) ipotizzando che varianti meno frequenti nella popolazione potessero essere causa di effetti più forti sui tratti complessi (Manolio TA 2009). Questa ipotesi si basa sul fatto che la pressione selettiva dell’evoluzione

mantiene bassa la frequenza di mutazioni fortemente deleterie per un determinato tratto, specialmente se patogenico. Ad oggi gli studi di GWAS hanno implementato al loro interno i dati provenienti da WES e WGS ottenuti dai grandi consorzi per permettere una mappatura più fine degli SNPs e per abbassare la soglia di frequenza dell'allele minore (MAF) minima osservabile a livello delle varianti infrequenti (0.5-0.1%).

Ovviamente, gli studi di GWAS hanno contribuito all'avanzamento delle conoscenze anche della genetica del DT2, che erano ancora poco chiare fino alla metà degli anni 2000. I primi studi su individui di origine europea hanno portato all'identificazione di oltre 10 geni associati al DT2 (Saxena R 2007; Qi L 2010; Scott LJ 2007; Zeggini E 2007).

Nel 2010 una meta analisi che coinvolgeva più di 50.000 partecipanti ha portato alla scoperta di altri 12 geni di suscettibilità per il DT2 in soggetti europei (Voight BF 2010), mentre venivano condotti altri studi GWAS e meta analisi in altri gruppi etnici (Cho YS 2012; Hanson RL 2014; Kooner JS 2011; Li H 2013; Ma RCW 2013; Palmer ND 2012; Saxena R 2013; Tabassum R 2013). Ad oggi sono stati identificati oltre 80 geni di suscettibilità per il DT2, alcuni legati all'insulino-resistenza, altri alla funzione delle cellule beta-pancreatiche, altri la cui funzione non è ancora del tutto nota (Bonfond A 2015), e gli studi sono in continuo avanzamento.

## **I POLIMORFISMI GENICI**

Si parla di polimorfismo genetico quando una variazione genetica ha una prevalenza maggiore dell'1% nella popolazione.

La variazione genetica può essere determinata da sostituzioni, delezioni o inserzioni di basi nel DNA e può riguardare regioni codificanti e regioni non codificanti. I loci polimorfici sono quelli per i quali almeno il 2% della popolazione risulta eterozigote. Le conseguenze di questi polimorfismi possono essere silenti con una variazione proteica con la stessa funzione, oppure una variazione nella sequenza aminoacidica che non altera la struttura della proteina e infine non silenti quando si avrà un cambiamento del fenotipo, ad esempio si avranno proteine modificate la cui funzione risulterà alterata. Il polimorfismo genetico è attivamente e costantemente mantenuto nelle popolazioni per selezione naturale, a differenza dei

polimorfismi transitori in cui una forma viene progressivamente sostituita da un'altra (Russell PJ 2010).

### **SNP (single nucleotide polymorphisms, polimorfismi di singoli nucleotidi)**

Le differenze in singole paia di basi sono note come polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), e possono essere rilevati attraverso il sequenziamento del DNA, l'analisi RFLP, e altri metodi come la PCR allele-specifica e l'ibridazione del DNA allele-specifico. Molte RFLP sono dovute a polimorfismi di singoli nucleotidi. Ci sono centinaia di migliaia di loci SNP in tutto il genoma umano, che lo rende particolarmente utile per la mappatura dei geni delle malattie umane. Dall'analisi della sequenza di porzioni del genoma emerge che le sequenze di DNA di due individui sono per la maggior parte identiche, con differenze nelle coppie di basi ogni 500-1000 coppie di basi. Se una coppia di basi è presente in una determinata posizione nella maggior parte degli individui, allora tale coppia è quella comune, e la presenza di un'altra coppia di basi in tale posizione rappresenta una variante meno comune. Se la variante meno comune ha una frequenza nella popolazione umana di almeno 1%, la posizione di quella base nel genoma è definita come un sito che contiene uno SNP. Nel genoma umano ci sono almeno 3 milioni di SNP. Questo tipo di polimorfismo è molto importante in genetica umana perché costituisce circa il 98% di tutti i polimorfismi (Harrison 2012).

Dato che gli SNPs rappresentano la forma più comune di variazione genetica nella popolazione, potrebbero essere utilizzati come marcatori biologici associati a malattie, come predittori della risposta individuale ai farmaci o come spie dell'eredità di geni di malattie all'interno delle famiglie. Sempre più studi in letteratura stanno indagando sul potenziale ruolo dei polimorfismi nei tumori, nella sclerosi multipla, nella malattia coronarica e nelle malattie metaboliche, tra cui DT1 e DT2, ma i risultati sono ancora controversi (Triunfo S 2017).

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo principale del mio progetto è stato lo studio del ruolo di varianti geniche (SNPs) in geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D.

### **1) SCOPI SPECIFICI**

Gli scopi specifici del mio progetto sono stati:

- a. analizzare SNPs del gene VDR (rs11568820 e rs2228570) per valutare l'associazione di tali polimorfismi con il DT2 in una coorte caso-controllo
- b. analizzare gli SNPs coinvolti nel metabolismo della vitamina D, individuati attraverso GWAS, nell'ambito della casistica di pazienti affetti da DT2 reclutata per un ampio studio prospettico longitudinale (Studio SUMMER)
- c. valutare la relazione tra gli SNPs coinvolti nel metabolismo della vitamina D e i livelli circolanti attraverso la misurazione delle concentrazioni di vitamina D in un sottogruppo di soggetti reclutati nello studio SUMMER

### **2) OBIETTIVI SECONDARI**

Gli obiettivi secondari del mio progetto sono stati studiare il ruolo di altri geni nell'ambito di altre popolazioni di pazienti, in particolare:

- a. analizzare lo SNP rs778114184 del gene APOA5 in un popolazione di 924 bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi Sardi

- b. resequencing del gene APLN e successiva genotipizzazione di 2 SNPs (rs181301686 e rs2281069 del gene APLN)

### **3) ALTRI OBIETTIVI**

Ulteriore obiettivo è stato valutare altri fattori di rischio per il DT2 e le sue complicanze, come l'infiammazione del tessuto adiposo, la presenza di grasso a livello epatico e pancreatico, e il ruolo della vitamina D nelle patologie dismetaboliche.

## **1) SCOPI SPECIFICI**

### **a. Analisi di associazione dello SNP rs11568820 del gene VDR con il DT2 in una coorte caso-controllo**

Dato che non ci sono studi precedenti che hanno analizzato una possibile associazione tra il polimorfismo rs11568820 e il DT2 e che questa variante è funzionale, abbiamo effettuato un studio di associazione genetica in un'ampia coorte di adulti italiani affetti da DT2 e di soggetti non diabetici.

Lo SNP rs11568820 è detto funzionale perché è l'unico polimorfismo del gene VDR che, essendo localizzato sul promoter, influenza la trascrizione del gene stesso.

Inoltre, poichè non è noto se la variante del gene VDR rs11568820 predisponga gli individui alle alterazioni metaboliche solo in età adulta o se la predisposizione inizi già in età precoce, abbiamo eseguito l'analisi di associazione anche in una coorte di bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi Sardi.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione**

Per questo studio sono stati selezionati 1788 soggetti consecutivi, 839 affetti da DT2 (391 maschi e 448 femmine), e 949 soggetti non diabetici (313 maschi e 636 femmine), tra i pazienti afferenti agli ambulatori dell'Università Sapienza di Roma. I motivi delle visite erano l'obesità, il diabete e le complicanze legate al diabete.

Tutti i soggetti senza diagnosi di diabete sono stati sottoposti a curva da carico orale con 75 grammi di glucosio con misurazione della glicemia e dell'insulinemia al basale e dopo 30, 60, 90 e 120 minuti. I soggetti sono stati classificati in soggetti con normale tolleranza al glucosio (NGT) e affetti da DT2 secondo i criteri ADA 2015.

Ad eccezione di 412 soggetti già con diagnosi di DT2, nessuno dei partecipanti assumeva farmaci ipoglicemizzanti, inclusi i 427 con nuova diagnosi di DT2. I soggetti che presentavano

alterata glicemia a digiuno (IFG), alterata tolleranza ai carboidrati (IGT) e/o entrambe le condizioni dopo l'OGTT sono stati esclusi dallo studio.

La coorte di bambini è stata precedentemente descritta (Cambuli VM 2009). Sono stati reclutati 878 bambini in sovrappeso/obesi (426 maschi e 452 femmine) afferenti all'ospedale di Cagliari per eccesso ponderale. La presenza di patologie endocrine o genetiche erano considerate criteri di esclusione dallo studio. Nessuno dei bambini era in trattamento farmacologico.

Al momento dell'arruolamento sono stati raccolti i dati demografici, clinici e antropometrici come descritto in precedenza (Cambuli VM 2009). Lo sviluppo puberale è stato determinato secondo la scala di Tanner e i bambini sono stati divisi in 2 gruppi: stadio pre-puberale (Tanner I) e puberale (Tanner II-V).

### **Esame clinico e indagini ematochimiche**

I partecipanti sono stati sottoposti ad anamnesi, esame obiettivo e prelievo venoso dopo almeno 12 ore di digiuno. I parametri antropometrici valutati sono stati peso, altezza, circonferenza vita ed è stato calcolato l'Indice di Massa Corporea (BMI, Kg/m<sup>2</sup>).

La diagnosi di ipertensione si è basata sulla presenza di elevati valori di pressione sistolica (>140 mmHg) e/o diastolica (>90 mmHg), e/o sull'assunzione di terapie anti-ipertensive.

I parametri ematochimici indagati sono stati: glicemia (mg/dl), insulinemia (IU/ml), emoglobina glicosilata (HbA1c, %), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato-aminotransferasi (AST, IU/l), alanino-aminotransferasi (ALT, IU/l), gamma-glutamilttranspeptidasi ( $\gamma$  GT, IU/l), attraverso metodi di laboratorio standard. Il colesterolo LDL è stato calcolato usando la formula di Friedwald.

L'insulinemia basale è stata misurata mediante metodo radio-immunoenzimatico (ADVIA Insulin Ready Pack 100, Bayer Diagnostics, Italy), con coefficiente di variazione intra-intercampionario <5%.

### **Indici di insulino-resistenza e insulino-secrezione**

L'HOMA-IR (Modello di valutazione omeostatico di insulino resistenza), l'HOMA-B (Modello di valutazione omeostatico della funzione beta-cellulare) e l'Indice di Sensibilità Insulinica (ISI) sono stati calcolati come precedentemente mostrato da Matthews et al. (Matthews DR 1985) e Matsuda et al. (Matsuda M 1999). La secrezione insulinica glucosio-indotta è stata stimata attraverso il calcolo della Risposta Insulinica Corretta (CIR) (Sluiter WJ 1976). Il vantaggio

principale di questo parametro consiste nella sua indipendenza dai livelli di glicemia iniziali e a 30 minuti. Il Disposition Index (DI), che consiste nella secrezione insulinica aggiustata per la sensibilità insulinica, è stato calcolato usando la formula  $CIR30 \times ISI$  (Lyssenko V 2009).

## **Genetica**

La genotipizzazione dello SNP rs11568820 G>A del gene VDR è stata eseguita mediante real-time PCR e High Resolution Melt (HRM) Analysis utilizzando lo strumento Eco™ Real-Time PCR System dell'Illumina. I primers utilizzati sono stati disegnati utilizzando la sequenza genomica del gene VDR GeneBank ID: 7421; forward primer: 5'-TGTAGAACATCTTTTGTATCAGGA-3' e reverse primer: 5'-AATGTAAGAAGCTGTAGCAAT-3'.

I frammenti di PCR (158 bp) sono stati amplificati in un volume di reazione di 10 µL con 0.5 µM di ogni primer, 10 ng di DNA, e 1x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix contenente EvaGreen® dye, HOT FIREPol® DNA Polymerase, dNTPs, e MgCl<sub>2</sub>.

Fasi della PCR: attivazione polimerasi (95° C per 15 min), amplificazione mediante 42 cicli di denaturation (95° C per 10 s), annealing (58°C per 25 s) ed extension (72° C per 15 s). Al termine dell'amplificazione è stata eseguita una curva di Melting mediante heating (95 °C per 15 s), cooling (fino a 60 °C per 15 s) e holding (fino a 95°C).

## **Statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego del software statistico SPSS versione 20.

Le variabili con distribuzione non normale sono state trasformate logaritmicamente prima dell'analisi.

Le variabili categoriche sono state comparate mediante test  $\chi^2$ .

Le variabili continue tra i diversi genotipi sono state valutate mediante test ANOVA.

Negli adulti i valori di p sono stati calcolati usando un modello di regressione lineare che includeva sesso, età e BMI come covariate.

Nei bambini i valori di p sono stati calcolati usando un modello di regressione lineare che includeva sesso, età, BMI-SDS e stadio di Tanner come covariate.

Nel testo i valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard o come percentuale, come appropriato.

## RISULTATI

Nella popolazione adulta la frequenza dell'allele A dello SNP rs11568820 era del 25%, simile a quella riportata negli Europei (HapMap-CEU) e nei Toscani (HAPMAP-TSI).

I genotipi erano in equilibrio di Hardy-Weinberg sia nei soggetti NGT che nei diabetici.

La distribuzione dei genotipi e la frequenza allelica nei soggetti sani e con DT2 sono mostrati in Tabella 1. Abbiamo osservato che il genotipo AA era significativamente più frequente nei pazienti adulti con DT2 rispetto ai controlli (7,5% vs 4,6%,  $p=0.037$ ), mentre la frequenza dell'allele A era maggiore nei pazienti con DT2 ma questa differenza non raggiungeva la significatività statistica (26.6% vs. 24.4%,  $p=0.076$ ). (Tabella 1)

	<b>DT2</b>	<b>NGT</b>	<b>P-value</b>
	n = 839	n = 949	
<b>Genotipi n (%)</b>			
<b>GG</b>	455 (54.2)	537 (56.6)	
<b>GA</b>	321 (38.3)	368 (38.8)	
<b>AA</b>	63 (7.5)	44 (4.6)	<b>0.037</b>
<b>Frequenza allelica (%)</b>			
<b>allele G</b>	73.4	75.6	
<b>allele A</b>	26.6	24.4	0.076

**Tabella 1. Associazione dello rs11568820 del gene VDR con il DT2**

Il calcolo dell'OR ha mostrato che i soggetti con genotipo omozigote AA avevano un maggior rischio di DT2 ( $OR_{Hom} = 1.69$  C.I.=[1.13-2.53]  $\chi^2=6.56$ ,  $p=0.011$ ); anche i portatori dell'allele A erano a maggior rischio, anche se non statisticamente significativo ( $OR_{Allelic} = 1.15$  C.I. = [0.98-1.34]  $\chi^2 = 3.22$ ,  $p=0.073$ ).

L'analisi di regressione logistica ha confermato l'associazione positiva del genotipo AA con la prevalenza di DT2 (OR 1.43, 95% CI 1,13-1,79,  $p=0.002$ ), in un modello recessivo aggiustato per sesso, età e BMI. (Tabella 2)

<b>Variabile indipendente</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>P-value</b>
<b>Età (anni)</b>	1.08	1.07 – 1.09	<0.001
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	1.02	1.005 – 1.03	0.005
<b>Sesso (M/F)</b>	0.64	0.51 – 0.80	<0.001
<b>Genotipo AA</b>	1.43	1.13 – 1.79	0.002

**Tabella 2. Analisi di regressione lineare multivariata. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

Non abbiamo osservato differenze statisticamente significative tra i genotipi riguardo sesso, età, BMI, circonferenza vita e fianchi e pressione arteriosa. Non vi erano differenze significative tra i 2 gruppi neanche riguardo colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi, AST e ALT. (Tabella 3)

	GENOTIPI		P-value
	GG+GA n. = 1681	AA n. = 107	
<b>Sesso (F/M)</b>	1026/655	58/49	n.s.
<b>Età (anni)</b>	48.1 ± 14.8	47.6 ± 15	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	37.2 ± 9.6	37.2 ± 9.6	n.s.
<b>CV (cm)</b>	114.7 ± 18.9	117.8 ± 20.2	n.s.
<b>PAS (mm/Hg)</b>	123 ± 23	127 ± 22.2	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	88 ± 20	88 ± 18.4	n.s.
<b>Col tot (mg/dl)</b>	199.8 ± 42.2	198.3 ± 42.6	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	147.8 ± 107.5	144.5 ± 101.6	n.s.
<b>HDL (mg/dl)</b>	49.4 ± 14.4	47.4 ± 11.1	n.s.
<b>LDL (mg/dl)</b>	120.4 ± 36.9	125.2 ± 35.2	n.s.
<b>AST (U/L)</b>	24.1 ± 13.9	23.6 ± 9.5	n.s.
<b>ALT (U/L)</b>	33.3 ± 25.4	36.5 ± 27.5	n.s.
<b>HbA1c (%)</b>	6.1 ± 1.3	6.1 ± 1.5	n.s.

**Tabella 3. Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della popolazione in relazione al genotipo VDR. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

Abbiamo quindi valutato l'associazione con i dati derivanti dall'OGTT, inclusi glicemia e insulinemia al basale, e gli indici surrogati di insulino-resistenza (HOMA-IR e ISI) e di insulino secrezione (HOMA-B e CIR-30).

Nella coorte adulta, lo SNP rs11568820 era associato a più alti livelli di glucosio a 30 e a 60 minuti durante OGTT e con ridotti indici di secrezione insulinica nelle beta-cellule (HOMA-B, CIR30 e DI). (Tabella 4)

	GENOTIPI		P-value
	GG+GA n. = 1302	AA n. = 74	
<b>Glicemia 0' (mg/dl)</b>	102,4 ± 38	106.3 ± 34.2	n.s.
<b>Insulinemia 0' (μUI/ml)</b>	22.4 ± 13.7	20.8 ± 12.3	n.s.
<b>HOMA-IR (U)</b>	5.4 ± 3.8	5.3 ± 3.8	n.s.
<b>HOMA-B</b>	340.4 ± 298.6	270.3 ± 229.8	<b>0.041</b>
<b>CIR30</b>	1.3 ± 1.1	0.95 ± 0.93	<b>0.022</b>
<b>ISI</b>	3.01 ± 2.33	2.72 ± 1.33	n.s.
<b>DI</b>	3.31 ± 3.57	2.32 ± 2.50	<b>0.014</b>

**Tabella 4. Sotto-analisi dei parametri glicemici e degli indici di secrezione insulinica derivanti dall'OGTT in un sottogruppo di pazienti stratificati per genotipo VDR.**

Sono stati inoltre misurati i livelli di vitamina D in un sottogruppo di 380 soggetti. Non abbiamo osservato differenze significative nei soggetti omozigoti AA rispetto ai soggetti GG+GA nei livelli di vitamina D (20.2 ± 10.2 vs. 17.9 ± 9.4 nmol/L, p=0.245).

Per esplorare ulteriormente il ruolo del gene VDR, abbiamo genotipizzato il polimorfismo rs11568820 in una coorte di bambini in sovrappeso e obesi.

Non abbiamo osservato differenze statisticamente significative tra i genotipi riguardo sesso, età, peso, BMI, SDS-BMI, pressione arteriosa, colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi, AST e ALT. (Tabella 5)

Abbiamo quindi valutato l'associazione con i dati derivanti dall'OGTT, inclusi glicemia e insulinemia al basale e a 120', HOMA-IR e HOMA-B. (Tabella 5)

	GENOTIPI		P-value
	GG+GA n. = 803	AA n. = 75	
<b>Sesso (F/M)</b>	415/388	37/38	n.s.
<b>Età (anni)</b>	10.4 ± 3.4	10.6 ± 2.9	n.s.
<b>Peso (Kg)</b>	56.4 ± 19.8	58.3 ± 17.4	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.4 ± 4.2	28.1 ± 5.6	n.s.
<b>SDS-BMI</b>	2.8 ± 1.2	2.9 ± 1.8	n.s.
<b>Pas (mm/Hg)</b>	105 ± 15	107 ± 13	n.s.
<b>Pad (mm/Hg)</b>	61 ± 9	62 ± 9	n.s.
<b>Col tot (mg/dl)</b>	167.4 ± 31.6	166.7 ± 32.7	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	63.6 ± 38.3	69.9 ± 51.8	n.s.
<b>HDL (mg/dl)</b>	51.3 ± 11.6	53.7 ± 13.2	n.s.
<b>LDL (mg/dl)</b>	103.4 ± 27.2	99 ± 29.3	n.s.
<b>AST (U/L)</b>	24.2 ± 11.9	24.9 ± 8.1	n.s.
<b>ALT (U/L)</b>	22.5 ± 12.2	24.7 ± 17.2	n.s.
<b>Glicemia 0' (mg/dl)</b>	88.9 ± 7.7	88.3 ± 6.9	n.s.
<b>Glicemia 120' (mg/dl)</b>	105.6 ± 20.4	108.6 ± 18.1	n.s.
<b>Insulinemia 0' (μUI/ml)</b>	14.6 ± 8.9	15.3 ± 10.4	n.s.
<b>Insulinemia 120' (μUI/ml)</b>	61.3 ± 45	69.4 ± 54.2	n.s.
<b>HOMA-IR (U)</b>	3.2 ± 2.1	3.4 ± 2.2	n.s.
<b>HOMA-B</b>	221.8 ± 168.5	227.5 ± 128.7	n.s.

**Tabella 5. Caratteristiche cliniche dei bambini stratificati secondo il genotipo VDR. P-value**

**<0.05 statisticamente significativo.**

E' stato recentemente riportato che livelli di glicemia normali-alti a 120 minuti  $\geq 110$  mg/dl sono un importante fattore di rischio cardio-metabolico nei bambini in sovrappeso-obesi (Di Bonito P 2014).

Abbiamo quindi stratificato i bambini secondo i livelli di glicemia a 120 min  $\geq 110$  mg/dl.

Nella coorte di bambini, il genotipo AA era significativamente più frequente nel gruppo con più alti livelli di glucosio a 2 ore dopo OGTT (2hPG cut-off  $\geq 110$  mg/dl) rispetto ai soggetti con livelli di glucosio inferiori a 110 mg/dl (11,3% vs 7,1%,  $p=0.035$ ).

Inoltre, il genotipo AA conferiva un più alto rischio sul profilo cardio-metabolico ( $OR_{Hom} = 2.05$  CI = [1,25-3,35]  $\chi^2 = 8.37$ ,  $p=0.004$ ). Non si osservava nessuna differenza in tutti gli altri parametri nei pazienti omozigoti per il genotipo AA.

## DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato per la prima volta la presenza di un'associazione della variante rs11568820 del gene VDR e il DT2 in una popolazione adulta Italiana.

Inoltre, abbiamo dimostrato che nella coorte di bambini in sovrappeso/obesi il polimorfismo rs11568820 era associato con alterazioni metaboliche già in età precoce, in particolare con livelli normali-alti di glicemia a 2 ore dall'OGTT, un indice rischio cardio-metabolico nei bambini (Di Bonito P 2014).

Nella coorte adulta, il genotipo AA era anche associato con gli indici HOMA-B, CIR30 e DI ridotti, suggerendo che la ridotta secrezione insulinica era indipendente dall'insulino-sensibilità.

Da questi risultati è emerso che nelle cellule beta questo polimorfismo del gene VDR ha un'influenza negativa sull'insulino-secrezione, aumentando il rischio di alterazione della glicemia.

Il nostro studio ha dimostrato per la prima volta che i portatori del genotipo AA del gene VDR hanno una maggiore suscettibilità per il DT2 e alterata secrezione insulinica. Finora, gli studi genetici sul VDR avevano condotto a risultati inconclusivi perché valutavano SNPs senza attività funzionale (Malecki MT 2003; Oh JY 2002). Il polimorfismo rs11568820 invece, è in grado di influenzare l'attività del gene VDR, spiegando l'aumento del rischio di DT2 nei portatori della variante osservato in questo studio.

Inoltre abbiamo dimostrato per la prima volta che nei bambini lo SNP rs11568820 del gene VDR è associato con livelli normali-alti di glicemia a 2 ore, un importante fattore di rischio cardio-metabolico (Di Bonito P 2014). I nostri dati suggeriscono che l'associazione tra la variante del gene VDR e il metabolismo del glucosio è presente non solo negli adulti, ma può influenzare il metabolismo già in età precoce.

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato per la prima volta che i portatori del genotipo AA del gene VDR hanno una maggiore suscettibilità per il DT2 e alterata secrezione insulinica. Nella coorte di bambini, l'associazione tra gli omozigoti AA e i più alti livelli di glucosio a 2 ore suggerisce che lievi alterazioni associate con questo genotipo possono comparire in età precoce.

Questo lavoro è stato pubblicato: **The vitamin D receptor (VDR) gene rs11568820 variant is associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion in Italian adult subjects, and associates with increased cardio-metabolic risk in children.**

**Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2016 May;26(5):407-13.**

## **b. Analisi di associazione dello SNP rs2228570 del gene VDR con il DT2 in una coorte caso-controllo**

Gli studi di associazione genetica tra lo SNP rs2228570 e il DT2 hanno condotto finora a risultati contraddittori, dovuti probabilmente al fatto che gli studi erano stati effettuati su coorti di etnie diverse o in coorti troppo piccole. Abbiamo quindi eseguito uno studio di associazione genetica in un'ampia coorte di adulti italiani affetti da DT2 e in soggetti non diabetici.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione**

Per questo studio sono stati selezionati 1713 soggetti consecutivi, 883 affetti da DT2 (430 maschi e 453 femmine) e 830 soggetti non diabetici (230 maschi e 600 femmine), tra i pazienti afferenti agli ambulatori dell'Università Sapienza di Roma. I motivi delle visite erano l'obesità, il diabete e le complicanze legate al diabete.

Tutti i soggetti senza diagnosi di diabete sono stati sottoposti a curva da carico orale con 75 grammi di glucosio con misurazione della glicemia e dell'insulinemia al basale e dopo 30, 60, 90 e 120 minuti. I soggetti sono stati classificati in soggetti con normale tolleranza al glucosio (NGT) e affetti da DT2 secondo i criteri ADA 2015.

257 soggetti presentavano alterata glicemia a digiuno (IFG), 222 alterata tolleranza ai carboidrati (IGT) e 188 entrambe le condizioni dopo l'OGTT e sono stati esclusi dallo studio.

### **Esame clinico e indagini ematochimiche**

I partecipanti sono stati sottoposti ad anamnesi, esame obiettivo e prelievo venoso dopo almeno 12 ore di digiuno. I parametri antropometrici valutati sono stati peso, altezza, circonferenza vita ed è stato calcolato il BMI.

La diagnosi di ipertensione si è basata sulla presenza di elevati valori di pressione sistolica (>140 mmHg) e/o diastolica (>90 mmHg), e/o sull'assunzione di terapie anti-ipertensive.

I parametri ematochimici indagati sono stati: glicemia (mg/dl), insulinemia (IU/ml), emoglobina glicosilata (HbA1c, %), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (mg/dl), trigliceridi (mg/dl),

aspartato-aminotransferasi (AST, IU/l), alanino-aminotransferasi (ALT, IU/l), gamma-glutamiltanspeptidasi ( $\gamma$  GT, IU/l), attraverso metodi di laboratorio standard. Il colesterolo LDL è stato calcolato usando la formula di Friedwald.

L'insulinemia basale è stata misurata mediante metodo radio-immunoenzimatico (ADVIA Insulin Ready Pack 100, Bayer Diagnostics, Italy), con coefficiente di variazione intra-intercampionario <5%.

La misurazione della 25(OH)D è stata eseguita con metodo colorimetrico (Lasion, DiaSorin) presso il laboratorio centralizzato su sieri centrifugati, separati e conservati per alcuni giorni a -25°C in frigoriferi di precisione dotati di termometro.

### **Indici di insulino-resistenza e insulino-secrezione**

L'HOMA-IR (Modello di valutazione omeostatico di insulino resistenza), l'HOMA-B (Modello di valutazione omeostatico della funzione beta-cellulare) e l'Indice di Sensibilità Insulinica (ISI) sono stati calcolati come precedentemente mostrato da Matthews et al. (Matthews DR 1985) e Matsuda et al. (Matsuda M 1999). La secrezione insulinica glucosio-indotta è stata stimata attraverso il calcolo della Risposta Insulinica Corretta (CIR) (Sluiter WJ 1976). Il vantaggio principale di questo parametro consiste nella sua indipendenza dai livelli di glicemia iniziali e a 30 minuti. Il Disposition Index (DI), che consiste nella secrezione insulinica aggiustata per la sensibilità insulinica, è stato calcolato usando la formula  $CIR_{30} \times ISI$  (Lyssenko V 2009).

### **Genetica**

La genotipizzazione dello SNP rs2228570 C>T è stata eseguita utilizzando il saggio TaqMan (Applied Biosystems) C\_12060045\_20 in un volume totale di 10  $\mu$ l utilizzando lo strumento EcoTM Real-Time PCR System dell'Illumina.

Fasi della PCR: attivazione polimerasi (95° C per 10 min), amplificazione mediante 45 cicli di denaturation (95° C per 15 s), annealing ed extension (60° C per 1 min).

Per assicurare la riproducibilità del metodo a lungo termine, in ciascun esperimento sono stati analizzati ogni volta tre campioni come controllo.

### **Statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego del software statistico SPSS versione 20.

Le variabili con distribuzione non normale sono state trasformate logaritmicamente prima dell'analisi.

Le variabili categoriche sono state comparate mediante test  $\chi^2$ .

Le variabili continue tra i diversi genotipi sono state valutate mediante test ANOVA.

Negli adulti i valori di p sono stati calcolati usando un modello di regressione lineare che includeva sesso, età e BMI come covariate.

Nel testo i valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard o come percentuale, come appropriato.

## **RISULTATI**

Nella nostra popolazione la frequenza dell'allele T era del 33%, simile a quella riportata in HAPMAP-TSI (38% nei Toscani).

Non si sono osservate differenze significative nella distribuzione genotipica e allelica tra i soggetti diabetici e i controlli. (Tabella 6)

	<b>DT2</b>	<b>NGT</b>	<b>P-value</b>
	n = 883	n = 830	
<b>Genotipi n (%)</b>			
<b>CC</b>	395 (44.7)	378 (45.5)	
<b>CT</b>	379 (43)	359 (43.3)	
<b>TT</b>	109 (12.3)	93 (11.2)	n.s.
<b>Frequenza allelica (%)</b>			
<b>Allele C</b>	66.2	67.2	
<b>Allele T</b>	33.8	32.8	n.s.

**Tabella 6. Associazione dello SNP rs2228570 con il DT2**

Abbiamo quindi analizzato le caratteristiche cliniche confrontando i tre genotipi. Non abbiamo osservato nessuna differenza statisticamente significativa riguardo sesso, età, BMI, circonferenza vita e fianchi, pressione arteriosa, assetto lipidico e transaminasi.

Data l'associazione riportata precedentemente dello SNP rs2228570 del gene VDR e gli indici di insulino resistenza (Filus A 2008; Chiu KC 2001), abbiamo valutato l'associazione con i dati derivanti dall'OGTT (glicemia e insulinemia al basale, indici surrogati di insulino-resistenza e di insulino-secrezione). Non abbiamo osservato nessuna differenza tra glicemia e insulinemia al basale e dopo curva da carico (OGTT), indici di insulino-resistenza (HOMA-IR) e insulino-sensibilità (ISI), indici di insulino-secrezione (HOMA-B e CIR30) e i tre genotipi.

La stessa analisi è stata condotta secondo il modello dominante (TT vs. CT + CC) e recessivo (TT vs. CT + CC), e non abbiamo osservato nessuna differenza significativa in tutti i parametri metabolici, clinici e derivanti dall'OGTT.

Inoltre, sono stati dosati i livelli di vitamina D in un sottogruppo di 637 soggetti; non abbiamo osservato nessuna differenza significativa tra i 3 genotipi (CC=  $22.7 \pm 11.1$ , CT=  $22.6 \pm 10.6$ , TT=  $23.5 \pm 11.2$ ,  $p=0.806$ ). È stata condotta la stessa analisi secondo i modelli dominante e recessivo ma non è stata osservata nessuna differenza tra i genotipi.

Inoltre, abbiamo paragonato i livelli di vitamina D tra maschi e femmine; come atteso le femmine mostravano livelli significativamente più bassi di vitamina D rispetto ai maschi ( $21.2 \pm 11.1$  vs  $24.3 \pm 10.3$ ,  $p<0.001$ ). Questa differenza era presente anche nei soli pazienti con DT2, (femmine vs maschi:  $22.8 \pm 11.8$  vs  $24.9 \pm 10.4$ ,  $p=0.036$ ), mostrando una relazione con lo stato metabolico.

## **DISCUSSIONE**

In questo studio abbiamo indagato se il polimorfismo rs2228570 del gene VDR fosse associato al DT2. Infatti, è stato dimostrato che il sistema della vitamina D ha un ruolo importante nel DT2 e nelle malattie cardiovascolari (Haussler MR 2013; Prietl B 2013).

Diversi studi, anche se condotti su piccole coorti, hanno mostrato la presenza di un'associazione tra le varianti del gene VDR, incluso lo SNP rs2228570 esaminato in questo studio, con il DT2 e con le alterazioni legate al DT2 (Yu F 2016; Neyestani TR 2013; Filus A 2008; Chiu KC 2001).

Nella nostra popolazione, invece, non abbiamo riscontrato nessuna associazione tra il polimorfismo rs2228570 e i tratti metabolici, incluso il diabete, in un'ampia coorte di soggetti. Abbiamo anche analizzato la variante nei maschi e nelle femmine separatamente, ma non abbiamo osservato nessuna differenza statisticamente significativa tra i genotipi divisi per sesso. Abbiamo condotto la stessa analisi anche secondo il modello recessivo e dominante, e non abbiamo osservato nessuna differenza.

Infine, abbiamo valutato l'associazione dello SNP con i livelli di vitamina D, ma non abbiamo osservato nessuna differenza.

Il nostro è stato il primo studio che ha valutato lo SNP rs2228570 in una coorte ampia e ben caratterizzata clinicamente di origine Caucasica. Infatti, l'unico studio condotto su una popolazione Caucasica costituita da un numero ragionevole di soggetti (n=548) è stato effettuato da Malecki e collaboratori. In accordo con i nostri risultati, gli autori non hanno riscontrato nessuna associazione tra la variante il DT2 (Malecki MT 2003).

Il nostro studio, condotto su 1713 soggetti, presentava un power adeguato per poter definire l'esatto ruolo della variante nel diabete.

Inoltre, una metanalisi recente sul polimorfismo rs2228570 ha dimostrato che la variante del gene VDR è associata significativamente al DT2 soltanto negli individui Cinesi e in particolare negli studi effettuati su pochi soggetti (n<200). Lo SNP rs2228570 non era associato al DT2 in altre coorti di differente etnia (Yu F 2016).

Dagli studi finora pubblicati, appare evidente che l'associazione del polimorfismo rs2228570 del gene VDR con il DT2 è contraddittoria, e una possibile spiegazione di questa divergenza potrebbe essere data dall'eterogeneità dei gruppi etnici analizzati, e soprattutto dal fatto che gli studi sono stati condotti su popolazioni troppo piccole.

In conclusione i nostri risultati suggeriscono che nella nostra popolazione il polimorfismo rs2228570 C>T del gene VDR non sembra avere un ruolo importante nella patogenesi del diabete.

Questo lavoro è stato pubblicato: **The vitamin D receptor functional variant rs2228570 (C>T) does not associate with type 2 diabetes mellitus.**

**Endocr Res. 2017 Apr 7:1-5.**

### **c. Analisi di SNPs coinvolti nel metabolismo della vitamina D, individuati attraverso GWAS, in un'ampia coorte di pazienti con DT2**

In questo studio sono stati analizzati gli SNPs dei geni DHCR7, CYP2R1 e GC che sono stati trovati associati allo stato di vitamina D in studi di GWAS e di associazione genetica (Dastani Z 2013; McGrath JJ 2010; Ahn J 2010; Wang TJ 2010). Inoltre, è stato analizzato lo SNP rs11568820 del gene VDR per esplorare ulteriormente il ruolo di questo polimorfismo dato che nel nostro studio precedente (vedi paragrafo "a" del capitolo SCOP1 SPECIFICI e Sentinelli F 2016) abbiamo dimostrato per la prima volta che i portatori del genotipo AA di questo SNP avevano una maggiore suscettibilità per il DT2 e alterata secrezione insulinica.

Questo scopo si è svolto nell'ambito del progetto SUMMER (Sapienza University Mortality and Morbidity Event Rate) nel diabete; quest'ultimo consiste in uno studio prospettico osservazionale multicentrico di 5 anni che ha lo scopo di identificare nuove molecole in grado di predire il rischio cardiovascolare nei pazienti affetti da DT2 e di contribuire a definirne i meccanismi.

Il primo obiettivo del SUMMER è quello di identificare, all'interno di una vastissima popolazione di pazienti con DT2 (previsione reclutamento 5000 soggetti), il tasso di mortalità per tutte le cause; successivamente verrà approfondito lo studio dei dati relativi alla mortalità specificamente per eventi cardiovascolari, con particolare riferimento all'incidenza di infarto del miocardio, ictus cerebrale e insufficienza renale terminale.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione**

Per lo studio "SUMMER" sono stati reclutati finora, in diversi centri diabetologici italiani, oltre 4400 soggetti consecutivi affetti da DT2.

I criteri di inclusione applicati per l'ingresso nello studio sono stati:

- età > 18 anni
- diagnosi di DT2

- accettazione consapevole del consenso informato

I criteri di esclusione sono stati:

- malattie psichiatriche gravi
- malattie renali allo stadio terminale
- dialisi
- cirrosi
- cancro in fase attiva
- trattamento cronico con corticosteroidi

Sono stati reclutati inoltre circa 200 soggetti sani come controlli.

### **Esame clinico e indagini ematochimiche**

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad anamnesi personale per raccogliere informazioni riguardo età, sesso, abitudine al fumo, condizione di menopausa nelle donne e ad anamnesi familiare riguardo la storia di diabete (tre generazioni consecutive) e di malattie cardiovascolari (parenti di primo grado). Sono stati inoltre registrati la data di diagnosi di diabete, l'eventuale presenza di episodi ipoglicemici e le terapie in corso (farmaci ipolipidemizzanti, anti-ipertensivi, antiaggreganti, anticoagulanti, steroidi, antiinfiammatori non steroidei, immunomodulatori, androgeni, estrogeni e terapie antifratture). E' stata raccolta l'anamnesi patologica riguardo la storia di eventi cardiovascolari precedenti (infarto del miocardio, ictus, ulcera / gangrena / amputazione e procedure di rivascolarizzazione) e delle principali comorbidità (cancro, malattie croniche del fegato, BPCO, malattie endocrine, malattie renali, fratture e disfunzioni cognitive). Sono state inoltre valutate le abitudini dietetiche e l'attività fisica attraverso questionari validati (INRAN e IPAQ).

I partecipanti sono stati sottoposti a esame obiettivo e prelievo venoso dopo almeno 12 ore di digiuno. I parametri antropometrici valutati sono stati peso, altezza, circonferenza vita ed è stato calcolato l'Indice di Massa Corporea (BMI, Kg/m<sup>2</sup>).

I parametri ematochimici indagati sono stati: emoglobina glicosilata (HbA1c, %), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato-aminotransferasi (AST, IU/l), alanino-aminotransferasi (ALT, IU/l), gamma-glutamiltanspeptidasi (γGT, IU/l), fosfatasi

alcalina (IU/l), azotemia (mg/dl), creatinina (mg/dl), rapporto albumina/creatinina nelle urine (ACR), acido urico (mg/dl) attraverso metodi di laboratorio standard in ciascuno dei centri partecipanti.

I risultati ottenuti sono stati standardizzati al fine di minimizzare le differenze derivanti dai dosaggi dei diversi laboratori. Inoltre, la velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) è stata calcolata dal livello di creatinina sierica utilizzando l'equazione CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration).

Il bilancio corporeo di vitamina D è stato stimato in tutti i partecipanti misurando la concentrazione sierica di 25(OH)D, la forma circolante più stabile di questo ormone. La misurazione della 25(OH)D è stata eseguita con metodo chemiluminescente (ARBL, Salt Lake City, UT, USA) presso il laboratorio centralizzato su sieri centrifugati, separati e conservati in frigorifero a -80 °C.

Al fine di evitare l'introduzione di un bias legato alla diversa inclinazione dei raggi solari durante i diversi periodi dell'anno, e quindi alla differente possibilità di produrre vitamina D sulla superficie cutanea, durante le analisi statistiche i dati sono stati corretti per la stagione del prelievo.

Ulteriori campioni di sangue e urine (ogni 5 pazienti) sono stati aliquotati e conservati in frigorifero a -80 °C per successive analisi genomiche, trascrizionali e metabolomiche.

## **Genetica**

Di questi 4400 campioni raccolti, 2165 aliquote di DNA genomico sono disponibili nel nostro laboratorio e su queste è stata effettuata la genotipizzazione per i 4 polimorfismi selezionati.

Sono stati studiati i seguenti SNPs: DHCR7 rs12785878 T>G, CYP2R1 rs10741657 G>A, GC rs4588 G>T e VDR rs 11568820 G>A.

I campioni di sangue sono stati raccolti in tubi contenenti EDTA e il DNA genomico è stato estratto da tutti i campioni di sangue raccolti mediante "DNA Isolation Kit for Mammalian Blood" seguendo le istruzioni fornite dalla ditta (Roche Diagnostics).

In breve, il kit di isolamento del DNA si basa sulla separazione dei globuli bianchi dal sangue intero attraverso una lisi dei globuli rossi. In presenza di un reagente anionico forte, i leucociti vengono lisati e le proteine vengono così rimosse per disidratazione e precipitazione. Il DNA purificato viene successivamente recuperato mediante precipitazione di etanolo.

La genotipizzazione degli SNPs è stata eseguita utilizzando i saggi TaqMan (Applied Biosystems) C\_32063037\_10 per DHCR7 rs12785878 T>G, C\_2958430\_10 per CYP2R1 rs10741657 G>A, C\_8278879\_10 per GC rs4588 G>T, e C\_2880808\_10 per VDR rs 11568820 G>A in un volume totale di 10 µl utilizzando lo strumento EcoTM Real-Time PCR System dell'Illumina.

Fasi della PCR: attivazione polimerasi (95° C per 3 min), amplificazione mediante 45 cicli di denaturation (95° C per 15 s), annealing ed extension (60° C per 1 min).

Per assicurare la riproducibilità del metodo a lungo termine, in ciascun esperimento sono stati analizzati ogni volta tre campioni come controllo.

### **Statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego del software statistico SPSS versione 20.

Le variabili con distribuzione non normale sono state trasformate logaritmicamente prima dell'analisi.

Le variabili categoriche sono state comparate mediante test  $\chi^2$ .

Le variabili continue tra i diversi genotipi sono state valutate mediante test ANOVA.

I valori di p sono stati calcolati usando un modello di regressione lineare che includeva sesso, età, HbA1c, BMI e stagione come covariate.

Nel testo i valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard o come percentuale, come appropriato.

Il calcolo del sample-size effettuato a priori aveva attestato che la nostra casistica era sufficiente per ottenere un power > 90%, e la post-hoc analysis ha confermato la validità di tale numerosità.

## RISULTATI

Sono stati genotipizzati per ogni polimorfismo 2165 soggetti affetti da DT2 e circa 200 soggetti di controllo non diabetici. Sono stati inoltre valutati i livelli di vitamina D in un sottogruppo di 1393 soggetti diabetici.

### DHCR7 rs12785878 T>G

Nei soggetti affetti da DT2, la frequenza dell'allele G dello SNP rs12785878 del gene DHCR7 era significativamente minore rispetto a quella riscontrata nei soggetti non diabetici (29% vs 34%,  $p=0.04$ ).

Infatti, la prevalenza del genotipo omozigote (GG) nei pazienti diabetici è risultata minore in maniera statisticamente significativa rispetto ai soggetti sani (6.3% vs 8.6%,  $p=0.003$ ).

(Grafico 1)

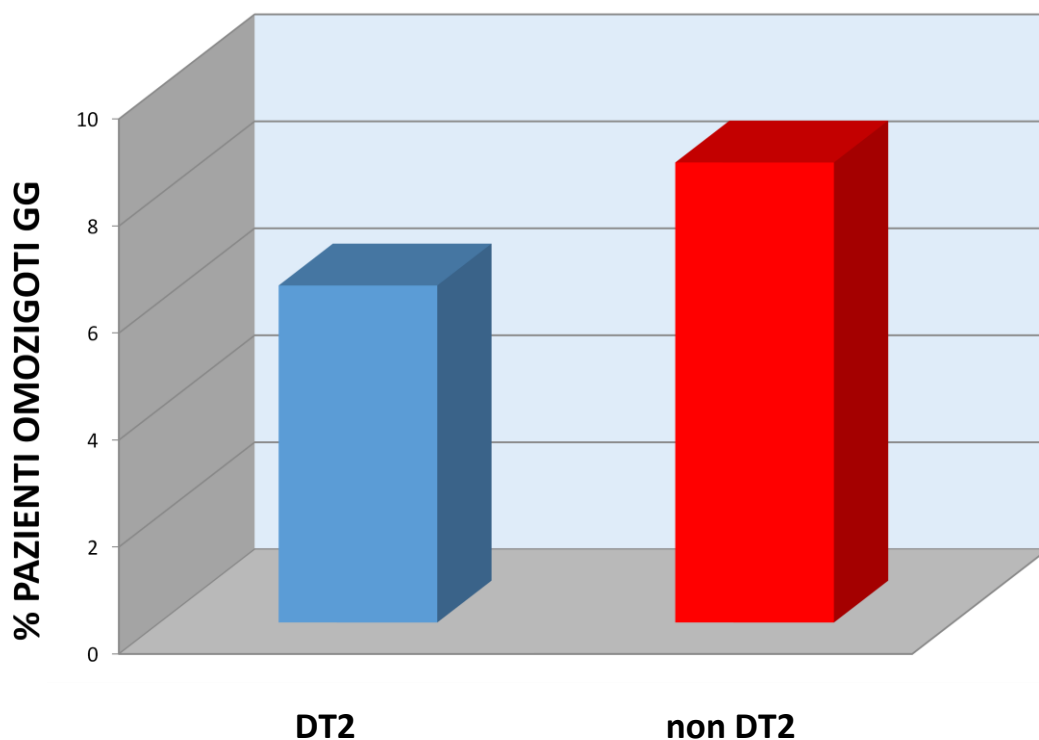


Grafico 1. Prevalenza del genotipo GG del gene DHCR7 nei pazienti diabetici e non diabetici.

Il genotipo GG del polimorfismo rs12785878 del gene DHCR7 è risultato significativamente associato con ridotti livelli di vitamina D rispetto ai genotipi TT e GT ( $21.6 \pm 9.8$  vs  $25.1 \pm 10.5$  vs  $24.2 \pm 10.8$  ng/ml,  $p < 0.001$ ) e ad una più giovane età ( $63.8 \pm 10.8$  vs  $66.7 \pm 9.7$  vs  $66.2 \pm 9.9$ ,  $p = 0.001$ ). (Tabella 7)

	GENOTIPI			p-value
	TT n=1099	TG n=856	GG n=210	
<b>Sesso (F/M)</b>	442/657	339/517	86/124	n.s.
<b>Età (anni)</b>	66.7±9.7	66.2±9.9	63.8±10.8	<b>0.001</b>
<b>Peso (Kg)</b>	82.2±17.1	83.3±18.1	83.1±16.3	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.8±5.5	29.8±5.9	29.8±4.9	n.s.
<b>CV (cm)</b>	103.3±13.4	104.9±33.1	104.1±13.6	n.s.
<b>HbA1c (mg/dl)</b>	7.2±1.4	7.3±1.4	7.4±1.5	n.s.
<b>PAS (mm/Hg)</b>	135±15	134.5±15.5	135.7±15.4	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	78.7±9	79±9.2	78.8±9.1	n.s.
<b>COL TOT (mg/dl)</b>	170.9±37.7	172.3±39.1	174.2±39.9	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	140.5±76	146±98.1	154±155.4	n.s.
<b>COL HDL (mg/dl)</b>	46.5±12.5	46.7±13.5	46±12.1	n.s.
<b>COL LDL (mg/dl)</b>	96.5±33.4	97±33.7	99.6±33.9	n.s.
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.88±0.43	0.87±0.42	0.94±0.47	n.s.
<b>Vitamina D (ng/ml)</b>	25.1±10.5	24.2±10.8	21.6±9.8	<b>&lt;0.001</b>

**Tabella 7. Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della popolazione di pazienti affetti da DT2 in relazione al genotipo DHCR7. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

Il calcolo dell'OR ha mostrato che i soggetti con genotipo omozigote GG avevano un maggior rischio di ipovitaminosi (ORHom = 1.92 CI = [1.2-3.1], p=0.005).

All'analisi di regressione lineare multivariata si è osservato che il polimorfismo rs12785878 si associava con più bassi livelli di vitamina D indipendentemente dalla stagione, dall'emoglobina glicata, dall'età, dal sesso e dal BMI. (Tabella 8)

<b>Variabile indipendente</b>	<b>Coefficiente di regressione standard</b>	<b>t-value</b>	<b>p-value</b>
<b>Età</b>	-0.063	-2.271	0.023
<b>Sesso</b>	0.079	2.896	0.004
<b>BMI</b>	-0.153	-5.513	<0.001
<b>HbA1c</b>	-0.172	-6.324	<0.001
<b>Stagione</b>	-0.156	-5.816	<0.001
<b>rs12785878</b>	-0.101	-3.750	<0.001

**Tabella 8. Analisi di regressione lineare multivariata. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

### CYP2R1 rs10741657 G>A

Nei soggetti affetti da DT2 la frequenza dell'allele A dello SNP rs10741657 del gene CYP2R1 era minore, anche se non statisticamente significativa, rispetto ai soggetti sani (29% vs 33%, p=0.19). Nei pazienti affetti da DT2, tuttavia, la prevalenza del genotipo omozigote (AA) era maggiore rispetto ai soggetti non diabetici (8.1% vs 6.7%, p=0.076).

Il genotipo AA del polimorfismo rs10741657 del gene CYP2R1 era significativamente associato con ridotti valori di HbA1c rispetto ai genotipi GG e GA ( $7 \pm 1.2$  vs  $7.3 \pm 1.5$  vs  $7.3 \pm 1.4$  mg/dl, p=0.05). (Tabella 9)

	GENOTIPI			p-value
	GG n=1069	GA n=895	AA n=201	
<b>Sesso (F/M)</b>	637/432	543/352	120/81	n.s.
<b>Età (anni)</b>	66.5±9.6	66±10.3	65.3±9.7	n.s.
<b>Peso (Kg)</b>	82.8±17.2	82.9±18.2	81.7±15.7	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.9±5.6	29.8±5.7	29.4±4.9	n.s.
<b>CV (cm)</b>	103.8±13.7	104.4±32.4	102.7±12.1	n.s.
<b>HbA1c (mg/dl)</b>	7.3±1.5	7.3±1.4	7±1.2	<b>0.05</b>
<b>PAS (mm/Hg)</b>	135.6±15.4	134.4±15.3	133.4±13.9	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	78.9±9.3	78.6±8.9	79.2±8.4	n.s.
<b>COL TOT (mg/dl)</b>	172.3±38.8	171.3±37.8	171.6±39.9	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	145.8±81.7	143.9±114.8	135.3±64.7	n.s.
<b>COL HDL (mg/dl)</b>	46.2±12.7	46.5±12.7	48.4±13.9	n.s.
<b>COL LDL (mg/dl)</b>	97.1±34.2	97±32.5	96.8±34.8	n.s.
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.97±0.38	0.94±0.35	0.92±0.29	n.s.
<b>Vitamina D (ng/ml)</b>	23.9±9.7	24.5±11	26.7±12.5	n.s.

**Tabella 9. Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della popolazione di pazienti affetti da DT2 in relazione al genotipo CYP2R1. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

L'analisi di regressione lineare multivariata ha confermato che il polimorfismo rs10741657 si associava con più bassi livelli di HbA1c indipendentemente dall'età, dal sesso e dal BMI. (Tabella 10)

<b>Variabile indipendente</b>	<b>Coefficiente di regressione standard</b>	<b>t-value</b>	<b>p-value</b>
<b>Età</b>	-0.010	-3.098	0.002
<b>Sesso</b>	-0.094	-1.399	0.173
<b>BMI</b>	0.024	4.013	<0.001
<b>rs10741657</b>	-0.095	-1.907	0.037

**Tabella 10. Analisi di regressione lineare multivariata. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

### GC rs4588 G>T

Nella popolazione di individui diabetici, la frequenza dell'allele T dello SNP rs4588 del gene GC era maggiore, anche se non statisticamente significativa, rispetto ai soggetti sani (27% vs 25%, p=0.39). Inoltre, nei pazienti affetti da DT2 la prevalenza del genotipo omozigote (TT) era maggiore rispetto ai soggetti non diabetici (7.3% vs 5.2%, p=0.68).

I soggetti con genotipo omozigote TT presentavano livelli di vitamina D significativamente inferiori rispetto ai soggetti con genotipo GG e GT ( $22 \pm 9.4$  vs  $25.4 \pm 11.2$  vs  $23.6 \pm 9.7$  ng/ml, p=0.001). (Tabella 11)

	GENOTIPI			p-value
	GG n=1140	GT n=846	TT n=179	
<b>Sesso (F/M)</b>	459/681	336/510	73/106	n.s.
<b>Età (anni)</b>	66.3±9.9	66.2±10	65.6±9.9	n.s.
<b>Peso (Kg)</b>	83±17.6	82.8±17.6	81.1±16.1	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.9±5.5	29.8±5.9	29.4±5.1	n.s.
<b>CV (cm)</b>	103.6±13.8	104.8±33	102.5±12.7	n.s.
<b>HbA1c (mg/dl)</b>	7.3±1.4	7.1±1.4	7.3±1.5	n.s.
<b>PAS (mm/Hg)</b>	135±15.4	134.7±15	135.2±15.5	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	78.9±9.2	78.7±9	78.4±8.7	n.s.
<b>COL TOT (mg/dl)</b>	172.1±39.4	171.4±36.8	171.6±40.4	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	146.1±102.8	140.7±76.1	147.3±125.9	n.s.
<b>COL HDL (mg/dl)</b>	46.2±13.1	46.7±12.7	47.5±11.7	n.s.
<b>COL LDL (mg/dl)</b>	97.5±34.4	96.7±32.3	95.5±34.6	n.s.
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.89±0.42	0.88±0.45	0.85±0.40	n.s.
<b>Vitamina D (ng/ml)</b>	25.4±11.2	23.6±9.7	22±9.4	<b>0.001</b>

**Tabella 11. Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della popolazione di pazienti affetti da DT2 in relazione al genotipo GC. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

Il calcolo dell'OR ha mostrato che i soggetti con genotipo omozigote TT avevano un maggior rischio di ipovitaminosi (ORHom = 1.89 CI = [1.14-3.14], p=0.012).

All'analisi di regressione lineare multivariata si è osservato che il polimorfismo rs4588 si associava con più bassi livelli di vitamina D indipendentemente dalla stagione, dall'emoglobina glicata, dall'età, dal sesso e dal BMI. (Tabella 12)

<b>Variabile indipendente</b>	<b>Coefficiente di regressione standard</b>	<b>t-value</b>	<b>p-value</b>
<b>Età</b>	-0.001	-2.088	0.037
<b>Sesso</b>	0.029	2.856	0.004
<b>BMI</b>	-0.005	-5.546	<0.001
<b>HbA1c</b>	-0.022	-6.555	<0.001
<b>Stagione</b>	-0.058	-5.813	<0.001
<b>rs12785878</b>	-0.033	-4.296	<0.001

**Tabella 12. Analisi di regressione lineare multivariata. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

### VDR rs11568820 G>A

La frequenza dell'allele A dello SNP rs11568820 del gene VDR nei pazienti affetti da DT2 era paragonabile a quella dei soggetti non diabetici (25% vs 24%, p=0.63). Nei pazienti diabetici la prevalenza del genotipo omozigote (AA) era maggiore, anche se non statisticamente significativa, rispetto ai soggetti non diabetici (6.3% vs 3.6%, p=0.68).

Per questo polimorfismo la popolazione è stata studiata valutando i soggetti GG vs GA+AA (modello dominante).

I soggetti portatori di almeno un allele di rischio presentavano livelli significativamente aumentati di HbA1c ( $7.4 \pm 1.5$  vs  $7.2 \pm 1.4$  mg/dl, p=0.044) e una più giovane età ( $65.7 \pm 9.9$  vs  $66.6 \pm 9.9$ , p=0.039). (Tabella 13)

	GENOTIPI		p-value
	GG n=1228	GA+AA n=937	
<b>Sesso (F/M)</b>	494/734	372/565	n.s.
<b>Età (anni)</b>	66.6±9.9	65.7±9.9	<b>0.039</b>
<b>Peso (Kg)</b>	82.7±17.4	82.9±17.6	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.8±5.6	29.8±5.6	n.s.
<b>CV (cm)</b>	104.4±28.2	103.4±14.1	n.s.
<b>HbA1c (mg/dl)</b>	7.2±1.4	7.4±1.5	<b>0.044</b>
<b>PAS (mm/Hg)</b>	134.3±15.2	135.6±15.3	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	78.7±9.1	78.9±9	n.s.
<b>COL TOT (mg/dl)</b>	172.3±38.9	171±37.9	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	144.4±97.5	143.6±92.9	n.s.
<b>COL HDL (mg/dl)</b>	46.6±13	46.4±12.7	n.s.
<b>COL LDL (mg/dl)</b>	97.4±34.3	96.5±32.6	n.s.
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.95±0.32	0.96±0.38	n.s.
<b>Vitamina D (ng/ml)</b>	24.2±10.3	24.6±10.8	n.s.

**Tabella 13. Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della popolazione di pazienti affetti da DT2 in relazione al genotipo VDR. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

All'analisi di regressione lineare multivariata si è osservato che l'associazione del polimorfismo rs11568820 con i livelli maggiori di HbA1c non era indipendente da fattori di confondimento come l'età, il sesso e il BMI (Tabella 14).

Variabile indipendente	Coefficiente di regressione standard	t-value	p-value
Età	-0.010	-2.907	0.004
Sesso	-0.096	-1.421	0.156
BMI	0.024	4.075	<0.001
rs11568820	0.058	1.744	0.081

**Tabella 14. Analisi di regressione lineare multivariata. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

### Genetic Risk Score (GRS)

L'aggregazione di informazioni di più SNPs, ognuno con i suoi effetti, in un singolo punteggio di rischio genetico è diventato uno strumento utile per esaminare la capacità predittiva cumulativa delle variazioni genetiche in diverse patologie e nei fenotipi ad esse correlati (Humphries SE 2008). Gli usi emergenti del Genetic Risk Score (GRS) sono molteplici, tra cui la predizione di malattie nelle popolazioni ad alto rischio, gli studi di interazione genetica con l'ambiente e gli studi di Randomizzazione Mendeliana (Smith JA 2015).

Per creare un GRS, è necessario prima selezionare le varianti genetiche da includere nel punteggio di rischio. Sebbene in studi precedenti il GRS veniva creato includendo SNPs provenienti da studi su geni candidati (Morrison AC 2007; Brautbar A 2012), i GRS più recenti vengono costruiti usando SNPs trovati associati a tratti o patologie attraverso GWAS.

Quando vengono assegnati pesi uguali a ciascuna variante genetica, il punteggio è detto "non ponderato" e la sua costruzione si basa sull'ipotesi che ogni allele conferisca un rischio identico.

Tuttavia, per i tratti più complessi, le dimensioni degli effetti tra gli SNPs identificati variano; pertanto, i GRS possono essere costruiti ponderando gli SNPs per le loro dimensioni di effetto, dando maggior peso a varianti con effetti più forti. I punteggi ponderati possono aumentare la potenza statistica rispetto ai punteggi non ponderati, e in questo caso si parla di "GRS pesato" (WGRS) (Smith JA 2015).

In questo studio è stato quindi calcolato un GRS sulla base dei 4 SNPs studiati per valutare l'associazione dello score con i livelli di Vitamina D.

Il GRS è stato calcolato mediante la somma degli alleli di rischio per ognuno dei 4 polimorfismi in ciascun individuo; in particolare i genotipi per ogni SNP sono stati valutati secondo un modello additivo:

0: omozigoti per l'allele non di rischio

1: eterozigoti

2: omozigoti per l'allele di rischio (Tabella 15)

<b>n alleli di rischio</b>	<b>n individui (%)</b>
<b>0</b>	106 (7.6)
<b>1</b>	315 (22.6)
<b>2</b>	409 (29.4)
<b>3</b>	318 (22.9)
<b>4</b>	176 (12.6)
<b>5</b>	53 (3.8)
<b>6</b>	13 (0.9)
<b>7</b>	3 (0.2)

**Tabella 15. Stratificazione della popolazione secondo il numero degli alleli di rischio per i 4 polimorfismi.**

Nella nostra popolazione si è ottenuto un range da 0 a 7 e poiché le categorie agli estremi (0, 5, 6 e 7) erano costituite da una percentuale di individui molto bassa, le 8 categorie sono state suddivise in quartili ed è stata valutata l'associazione dei quartili con i livelli di Vitamina D.

E' stata osservata un'associazione con la Vitamina D, che diminuisce significativamente dal 1° al 4° quartile ( $24.9 \pm 9.9$  vs  $25.1 \pm 10.9$  vs  $23.7 \pm 10.8$  vs  $23.4 \pm 10.6$  ng/ml,  $p=0.03$ ) (Tabella 16), con un OR = 1.32 (C.I. = [1.1-1.6],  $p=0.005$ ).

Quartili	n individui	Vitamina D	p-value
1	421	24.9±9.9	
2	409	25.1±10.9	
3	318	23.7±10.8	
4	245	23.4±10.6	<b>0.03</b>

**Tabella 16. Associazione del GRS con i livelli di vitamina D.**

E' stato valutato anche un GRS pesato (WGRS) calcolando un OR di rischio di ipovitaminosi D utilizzando il cut-off di 30 ng/ml. Il WGRS è stato quindi ottenuto moltiplicando l'OR per ogni allele di rischio di ciascun gene.

E' stata osservata un'associazione con la Vitamina D, che diminuisce significativamente dal 1° al 4° quartile ( $26.3 \pm 11.8$  vs  $24 \pm 10.2$  vs  $24.6 \pm 10.7$  vs  $22.8 \pm 9.2$  ng/ml,  $p=0.001$ ). (Tabella 17)

Quartili	n individui	Vitamina D	p-value
1	353	26.3±11.8	
2	340	24±10.2	
3	344	24.6±10.7	
4	321	22.8±9.2	<b>0.001</b>

**Tabella 17. Associazione del WGRS con i livelli di vitamina D.**

E' stato valutato infine un GRS pesato soltanto per i geni DHCR7 e GC, i due geni che sono risultati in grado di influenzare significativamente i livelli di vitamina D, moltiplicando l'OR di rischio di ipovitaminosi (cut-off di 30 ng/ml) per ogni allele di rischio dei 2 geni.

E' stata osservata un'associazione con la Vitamina D, che diminuisce significativamente dal 1° al 4° quartile (26.3 ± 11.2 vs 25 ± 10.8 vs 22.8 ± 9.7 vs 21.7 ± 9.6 ng/ml, p<0.001). (Tabella 18)

Quartili	n individui	Vitamina D	p-value
1	347	26.3±11.2	
2	556	25±10.8	
3	261	22.8±9.7	
4	195	21.7±9.6	<b>&lt;0.001</b>

**Tabella 18. Associazione del WGRS dei 2 geni (DHCR7 e GC) con i livelli di vitamina D.**

## DISCUSSIONE

In questo studio sono stati analizzati 4 varianti polimorfiche in geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D in una popolazione di 2165 soggetti affetti da DT2; sono stati inoltre dosati i livelli di vitamina D in un sottogruppo di quasi 1400 pazienti.

E' stata osservata un'associazione significativa delle varianti rs12785878 del gene DHCR7 e rs4588 del gene GC con livelli ridotti di vitamina D; la variante del gene DHCR7 è risultata associata significativamente anche ad una più giovane età.

L'enzima DHCR7 rimuove il pre-colesterolo dalla via della vitamina D riducendo il substrato disponibile per la formazione di 25(OH)D, e infatti abbiamo osservato che i soggetti portatori della mutazione che mostrano livelli più bassi di vitamina D presentano anche livelli più alti di colesterolo, anche se non viene raggiunta la significatività statistica.

Inoltre, la variante rs10741657 del gene CYP2R1 è risultata significativamente associata a livelli più bassi di HbA1c.

Infine, abbiamo osservato che la variante rs11568820 del gene VDR è associata a livelli di HbA1c significativamente più alti e a una più giovane età.

Il GRS ha confermato l'associazione delle 4 varianti genetiche con la vitamina D, mostrando che i soggetti portatori di un numero maggiore di alleli di rischio presentavano livelli inferiori di vitamina D.

Il GRS pesato per l'OR di rischio di ipovitaminosi ha confermato l'associazione delle 4 varianti con i bassi livelli di vitamina D, e la significatività dell'associazione era ancora più forte ( $p > 0.001$ ) quando il GRS veniva pesato considerando soltanto i due geni (DHCR7 e GC) che erano risultati influenzare significativamente i livelli di vitamina D, rafforzando ancora di più tale risultato.

In questo studio abbiamo quindi osservato che le varianti genetiche possono influenzare i livelli di vitamina D in maniera considerevole. Questi risultati confermano che le concentrazioni di 25(OH)D non dipendono soltanto dai fattori ambientali, come l'alimentazione e l'esposizione solare, ma anche dai fattori genetici. Gli studi genetici, quindi, possono aiutare a identificare gli individui a rischio di ipovitaminosi D.

Come affermato in una review abbastanza recente (Berry D 2011), l'influenza dei fattori genetici sullo stato della vitamina D è molto complessa.

Studi effettuati sul gene GC, che codifica per il trasportatore della vitamina D, suggeriscono che le variazioni genetiche potrebbero portare a differenze nella biodisponibilità della 25(OH)D. Gli studi di GWAS e sui geni candidati hanno esplorato gli effetti diretti degli SNPs sui livelli di vitamina D, ma s'ipotizza che i fattori genetici possano influenzare anche la risposta alle variazioni di sintesi e assunzione di vitamina D. Questo fattore potrebbe spiegare parte della "missing heritability" della vitamina D dato che i principali loci comuni identificati con gli studi GWAS spiegano ancora solo circa il 1-4% delle variazioni di vitamina D (Manolio TA 2009; Wang TJ 2010).

I nostri risultati sono in linea con studi precedenti che hanno dimostrato che i geni DHCR7, CYP2R1 e GC sono i principali loci coinvolti nel controllo ereditario dei livelli di vitamina D (Ye Z 2015). Gli SNPs dei geni DHCR7, CYP2R1 e GC sono stati trovati associati allo stato di vitamina D in studi di GWAS e di associazione genetica (Dastani Z 2013; McGrath JJ 2010; Ahn J 2010; Wang TJ 2010).

Le associazioni trovate tra le varianti comuni del gene DHCR7 e i livelli di vitamina D hanno dimostrato che l'enzima ha un ruolo importante nella regolazione dello stato di vitamina D, e il risultato ottenuto sulla nostra popolazione conferma tale relazione.

E' stato dimostrato in studi precedenti che mutazioni genetiche nel gene CYP2R1 comportano ipovitaminosi D (Cheng JB 2004) e che le varianti genetiche in CYP2R1 sono fortemente associate alle concentrazioni di 25(OH)D (Wjst 2006; Ramos-lopez E 2007; Nissen J 2014); nella nostra popolazione invece, non abbiamo osservato tale associazione.

Diversi studi su geni candidati hanno mostrato associazioni tra le varianti del gene GC e le concentrazioni di 25(OH)D (Lauridsen AL 2005; Kurylowicz A 2006; Abbas S 2008; Engelman CD 2008; Sinotte M 2009; Gozdzik A 2011; Nissen J 2014). In studi precedenti sono state osservate associazioni tra il gene GC e il DT2 nelle popolazioni asiatiche (Hirai M 1998; Ren W 2003; Shao XJ 2012), ma un simile risultato non è mai stato dimostrato nella popolazione Caucasica (Klupa T 1999; Ye WZ 2001; Malecki MT 2002; Wang G 2014).

I nostri risultati sono in accordo con tali osservazioni; infatti anche nella nostra popolazione abbiamo dimostrato un'associazione tra la variante del gene GC e i livelli di vitamina D, ma non abbiamo osservato nessuna associazione con i parametri legati al DT2.

In uno studio precedente (Sentinelli F 2016) abbiamo effettuato uno studio di associazione tra il polimorfismo rs11568820 G>A del gene VDR e il DT2 in una coorte di 839 adulti italiani con DT2 e in 949 soggetti non diabetici. Il nostro studio ha dimostrato per la prima volta che i portatori del genotipo AA del gene VDR avevano una maggiore suscettibilità per il DT2 e un'alterata secrezione insulinica.

In questo studio abbiamo analizzato la stessa variante del gene VDR nei 2165 soggetti diabetici, e abbiamo osservato che la variante rs11568820 del gene VDR è associata a livelli di HbA1c significativamente più alti e a una più giovane età rispetto ai soggetti non portatori.

In conclusione, questo studio ha dimostrato la presenza di una stretta associazione tra polimorfismi dei geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D e i livelli circolanti, contribuendo a confermare il ruolo della genetica nella regolazione dei livelli di vitamina D.

## **PROSPETTIVE FUTURE**

Questo studio ha dimostrato la presenza di una stretta associazione tra polimorfismi dei geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D e i livelli circolanti.

Per testare se l'associazione tra i livelli di vitamina D e l'incidenza di eventi CV è causale o semplicemente casuale, sarà necessario applicare l'approccio di "Randomizzazione Mendeliana".

Al fine di individuare un nesso causale, l'approccio di "Randomizzazione mendeliana" permette di capire i meccanismi che causano la malattia. Ovvero, se un polimorfismo genetico (SNP) che è associato con un biomarcatore (livelli di vitamina D), è anche associato con la morte cardiovascolare e/o da tutte le cause, allora l'evidenza è in favore di una relazione causale tra il biomarcatore (livelli di vitamina D geneticamente determinati) e il rischio di mortalità e morbilità cardiovascolare in tali pazienti (Thanassoulis G 2013).

Il calcolo della potenza statistica dello studio SUMMER è stato effettuato sulla base di dati recentemente raccolti da un gruppo di collaboratori del progetto che hanno registrato un tasso di mortalità per tutte le cause di circa 2 su 100 persone-anno nei pazienti con DT2 in Italia. Con questa premessa, è stato stimato che seguire 5000 individui per 5 anni (per un totale di 500 casi

incidenti) fornirà un power del 90%, con un valore  $p=0.01$ , nel rilevare l'associazione con una variabile presente nel 30% dell'intera popolazione in studio che aumenta del 40% il rischio di mortalità per qualsiasi causa.

Lo studio proseguirà fino al raggiungimento dell'arruolamento di 5000 pazienti diabetici e con il follow-up dei pazienti reclutati.

Grazie ai dati che verranno registrati durante i 5 anni di follow-up del Summer si otterranno gli elementi necessari per testare l'associazione tra i polimorfismi studiati, i livelli di vitamina D e gli eventi cardiovascolari, secondo l'approccio di "Randomizzazione Mendeliana".

## **2) OBIETTIVI SECONDARI**

### **a. Analisi dello SNP rs778114184 del gene APOA5 in una popolazione di 924 bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi Sardi**

## **INTRODUZIONE**

Il gene APOA5, che codifica per l'apolipoproteina A-V (ApoA-V), si trova sul cromosoma 11 in posizione 11q23, è formato da 4 esoni e 3 introni e codifica per l'apolipoproteina A-V.

Nell'uomo è espresso quasi esclusivamente nel tessuto epatico (Pennacchio LA 2001); un'espressione minore è stata trovata soltanto nel piccolo intestino (Guardiola M 2012).

APOA5 potrebbe influenzare i livelli plasmatici di trigliceridi attraverso differenti possibili meccanismi. Il primo meccanismo suppone che APOA5 funzioni come attivatore della lipoprotein-lipasi aumentando il metabolismo delle particelle ricche di TG (Li Y 2014). Il secondo meccanismo prevede un possibile effetto di APOA5 sulla secrezione delle particelle VLDL (Beckstead JA 2003). Infine, la terza possibilità riguarda l'accelerazione della captazione da parte del fegato dei remnants delle lipoproteine (Nilsson SK 2011).

ApoA-V è un regolatore chiave dei livelli plasmatici di trigliceridi (TG) (Pennacchio LA 2001; Van der Vliet HN 2001) ma il meccanismo d'azione, soprattutto nell'uomo, è ancora poco chiaro.

E' stata descritta una correlazione inversa tra i livelli plasmatici di apoA-V e TG nei modelli animali (Pennacchio LA 2001; Van der Vliet HN 2002), che ha condotto all'idea che apoA-V potesse correlare negativamente con i livelli di TG anche nell'uomo. Studi recenti sull'uomo non hanno confermato tale relazione (Schaap FG 2006), mostrando invece una relazione positiva tra i livelli di apoA-V e i TG.

Sono stati studiati diversi polimorfismi del gene APOA5 che sono stati trovati associati con i livelli plasmatici di TG (Pennacchio LA 2002). Sono stati descritti più di 20 varianti rare del gene APOA5 (Pennacchio LA 2002; Hodoglugil U 2006; Kao JT 2003; Hubacek JA 2006); queste mutazioni sono state di solito trovate associate a ipertrigliceridemia (Melegh BI 2012).

Un recente lavoro di Sidore et al. effettuato su una popolazione sarda di 6602 adulti ha mostrato una nuova associazione tra la mutazione missenso Arg282Ser (rs778114184 G>T) del gene APOA5 e una diminuzione dei livelli di TG. Questa variante è stata trovata soltanto nella popolazione Sarda e sembra essere l'unica associata a una riduzione dei livelli di TG (Sidore C 2015).

Dato che l'associazione tra la mutazione Arg282Ser del gene APOA5 e i livelli di trigliceridi è stata osservata e studiata soltanto in una popolazione di soggetti adulti (Sidore C 2015), abbiamo effettuato uno studio di associazione genetica in una coorte di bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi della Sardegna.

Il nostro scopo era di esplorare se l'associazione tra la variante e i TG fosse già presente in giovane età, quando i fattori ambientali hanno avuto ancora poco tempo per agire.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione**

Per questo studio sono stati reclutati 925 bambini in sovrappeso e obesi (438 maschi e 487 femmine) presso l'ospedale di Cagliari. La presenza di patologie endocrine o genetiche erano considerate criteri di esclusione dallo studio. Nessuno dei bambini era in trattamento farmacologico. Al momento dell'arruolamento sono stati raccolti i dati demografici, clinici e antropometrici come descritto in precedenza (Cambuli VM 2009). Lo sviluppo puberale è stato determinato secondo la scala di Tanner e i bambini sono stati divisi in 2 gruppi: stadio pre-puberale (Tanner I) e puberale (Tanner II-V).

### **Esame clinico e indagini ematochimiche**

I partecipanti sono stati sottoposti ad anamnesi, esame obiettivo e prelievo venoso dopo almeno 12 ore di digiuno. I parametri antropometrici valutati sono stati peso, altezza, circonferenza vita ed è stato calcolato l'Indice di Massa Corporea (BMI, Kg/m<sup>2</sup>). Sono state misurate la pressione sistolica e diastolica.

I parametri ematochimici indagati sono stati: glicemia (mg/dl), insulinemia (IU/ml), emoglobina glicosilata (HbA1c, %), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato-aminotransferasi (AST, IU/l), alanino-aminotransferasi (ALT, IU/l), gamma-glutamilttranspeptidasi ( $\gamma$  GT, IU/l), attraverso metodi di laboratorio standard. Il colesterolo LDL è stato calcolato usando la formula di Friedwald. L'insulinemia basale è stata misurata mediante metodo radio-immunoenzimatico (DLS-1600 Insulin Radioimmunoassay Kit, Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, TX), con coefficiente di variazione intra-campionario compreso tra 4.7% e 12.2% e intercampionario compreso tra 4.5% e 8.3%.

I livelli sierici di ApoA-V sono stati dosati attraverso un kit ELISA (Aviva System Biology, San Diego CA) su sieri congelati e conservati a -80°C.

### **Indici di insulino-resistenza e insulino-secrezione**

L'HOMA-IR (Modello di valutazione omeostatico di insulino resistenza) e l'HOMA-B (Modello di valutazione omeostatico della funzione beta-cellulare) sono stati calcolati come precedentemente mostrato da Matthews et al. (Matthews DR 1985).

### **Genetica**

La genotipizzazione dello SNP rs778114184 G>T A del gene APOA5 è stata eseguita mediante real-time PCR e High Resolution Melt (HRM) Analysis utilizzando lo strumento Eco<sup>TM</sup> Real-Time PCR System dell'Illumina. I frammenti sono stati amplificati in un volume di reazione di 10  $\mu$ L con 0.5  $\mu$ M di ogni primer, 10 ng di DNA, e 1x LCGreen Plus+ Melting Dye.

Fasi della PCR: attivazione polimerasi (95° C per 3 min), amplificazione mediante 42 cicli di denaturation (95° C per 15 s), annealing ed extension (60° C per 1 min).

Al termine dell'amplificazione è stata eseguita una curva di Melting mediante heating (95 °C per 15 s), cooling (fino a 65 °C per 15 s), e holding (fino a 95°C).

I portatori della variante sono stati validati mediante sequenziamento.

Per assicurare la riproducibilità del metodo a lungo termine sono stati analizzati in ogni corsa 2 campioni GG e GT come controlli.

### **Statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego del software statistico SPSS versione 20.

Le variabili con distribuzione non normale sono state trasformate logicamente prima dell'analisi.

Le variabili categoriche sono state comparate mediante test  $\chi^2$ .

Le variabili continue tra i diversi genotipi sono state valutate mediante test ANOVA.

I valori di p sono stati calcolati usando un modello di regressione lineare che includeva sesso, età, BMI-SDS e stadio di Tanner come covariate.

Nel testo i valori sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard o come percentuale, come appropriato.

## **RISULTATI**

Tra i 925 bambini analizzati sono stati identificati 24 soggetti eterozigoti per la mutazione rs778114184 e nessun individuo omozigote. Le frequenze genotipiche erano in equilibrio di Hardy-Weinberg.

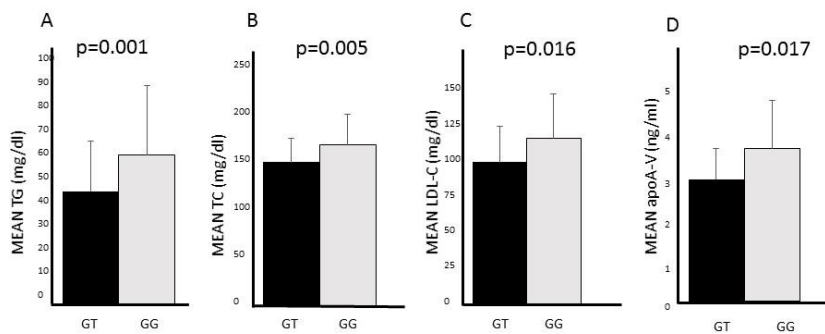
Abbiamo quindi valutato l'associazione tra il polimorfismo e le caratteristiche cliniche ed ematochimiche.

I portatori dello SNP mostravano livelli significativamente ridotti di trigliceridi (GT vs GG,  $48.2 \pm 31.6$  vs  $63.7 \pm 39.5$ ,  $p=0.001$ ), di colesterolo totale (GT vs GG,  $149.7 \pm 25.3$  vs  $167.8 \pm 32.3$ ,  $p=0.005$ ), e di LDL (GT vs GG,  $88.6 \pm 22.6$  vs  $103.4 \pm 28.2$ ,  $p=0.016$ ). (Tabella 19)

	GENOTIPI		P-value
	GG n. = 901	GT n. = 24	
<b>Sesso (F/M)</b>	477/424	10/14	n.s.
<b>Età (anni)</b>	10.4 ± 3.2	9.9 ± 3.2	n.s.
<b>Peso (Kg)</b>	57 ± 19.8	55 ± 18.5	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.4 ± 4.2	29.1 ± 9.3	n.s.
<b>SDS-BMI</b>	2.8 ± 1.2	3.6 ± 2.9	n.s.
<b>PAS (mm/Hg)</b>	106 ± 14.8	105 ± 14.6	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	61.7 ± 8.8	63 ± 8.7	n.s.
<b>Col tot (mg/dl)</b>	167.8 ± 32.3	149.7 ± 25.3	<b>0.005</b>
<b>TG (mg/dl)</b>	63.7 ± 39.5	48.2 ± 31.6	<b>0.001</b>
<b>HDL (mg/dl)</b>	51.5 ± 12.2	51.2 ± 11.1	n.s.
<b>LDL (mg/dl)</b>	103.4 ± 28.2	88.6 ± 22.6	<b>0.016</b>
<b>AST (U/L)</b>	24.4 ± 10.7	25.6 ± 5.9	n.s.
<b>ALT (U/L)</b>	23 ± 12.5	22.6 ± 7.8	n.s.
<b>Glicemia 0' (mg/dl)</b>	89 ± 7.6	88.2 ± 6.3	n.s.
<b>Glicemia 120' (mg/dl)</b>	105.5 ± 20.2	113.2 ± 17	n.s.
<b>Insulinemia 0' (μUI/ml)</b>	14.7 ± 9.1	17.9 ± 12.4	n.s.
<b>Insulinemia120'(μUI/ml)</b>	61.4 ± 51	90.3 ± 73.5	n.s.
<b>HOMA-IR (U)</b>	3.3 ± 2.1	4 ± 2.8	n.s.
<b>HOMA-B</b>	218.3 ± 183	257.3 ± 177.6	n.s.

**Tabella 19. Caratteristiche cliniche ed ematochimiche della coorte di bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi in relazione al genotipo APOA5. P-value <0.05 statisticamente significativo.**

La mutazione Arg282Ser (rs778114184 G>T) del gene APOA5 era associata quindi ad una riduzione dei livelli di TG (-15.5 mg/dl), colesterolo totale (-18.1 mg/dl) e colesterolo LDL (-14.8 mg/dl) nei bambini e adolescenti in sovrappeso/obesi. (Figura 2A, B e C)



**Figura 2. Livelli medi di TG (A), colesterolo totale (B) e colesterolo LDL (C) stratificati secondo il genotipo APOA5. Livelli medi di ApoA-V (D) in un sottogruppo di 24 bambini eterozigoti e 20 bambini wild-type stratificati per genotipo APOA5.**

All'analisi di regressione lineare multivariata abbiamo osservato che il BMI ( $p < 0.001$ ), la mutazione Arg282Ser ( $p < 0.001$ ), e l'HOMA-IR ( $p < 0.001$ ) erano associati significativamente e indipendentemente ai livelli di trigliceridi. (Tabella 20)

Variabile indipendente	Coefficiente di		
	regressione standard	t-value	P- value
Età	0.029	0.628	0.530
BMI	0.153	3.761	<0.001
Sesso	0.015	0.458	0.647
Stadio di Tanner	-0.017	-0.379	0.705
Arg282Ser SNP	-0.134	-4.229	<0.001
HOMA-IR	0.192	5.513	<0.001

**Tabella 20. Analisi di regressione lineare multivariata**

Con la stessa analisi abbiamo osservato anche un'associazione indipendente tra la mutazione Arg282Ser e il colesterolo totale ( $p=0.006$ ) e LDL ( $p=0.022$ ).

Inoltre, sono stati valutati i livelli sierici di ApoA-V nei 24 bambini risultati portatori della variante e in un gruppo di bambini risultati non portatori matchati per età, sesso e BMI; abbiamo osservato che i livelli di ApoA-V erano significativamente minori nei soggetti eterozigoti rispetto ai non portatori ( $3.07 \pm 0.78$  vs  $3.83 \pm 1.22$  ng/ml,  $p=0.017$ ) (Figura 2D) mostrando una relazione diretta tra i livelli di TG e di ApoA-V.

## DISCUSSIONE

I nostri dati hanno mostrato che la variante Arg282Ser (rs778114184 G>T) nel gene APOA5 è associata a una riduzione dei livelli di trigliceridi, di colesterolo totale e LDL in bambini e adolescenti in sovrappeso/obesi, mostrando che questa associazione è già presente in giovane

età prima che i fattori ambientali possano interagire. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi di regressione lineare multivariata, dove è stata osservata un'associazione indipendente della variante del gene APOA5. Inoltre, abbiamo osservato una riduzione significativa dei livelli di ApoA-V nei bambini portatori della variante, sottolineando una relazione diretta tra i livelli di ApoA-V e di trigliceridi.

L'idea che i livelli di ApoA-V e di trigliceridi sono positivamente correlati è supportata da diversi studi: Dallinga-Thie et al. (Dallinga-Thie GM 2006) in pazienti con DT2, Vaessen et al. (Vaessen SF 2006) in oltre 3000 soggetti e Henneman et al. (Henneman P 2007) in pazienti con ipertrigliceridemia severa. Inoltre, la relazione diretta tra ApoA-V e TG osservata in questo studio è in accordo anche con studi precedenti di Schaap et al. (Schaap FG 2006) in pazienti con elevati livelli di TG e di Talmud et al. (Talmud PJ 2006) in pazienti con DT2.

La ragione della correlazione positiva nell'uomo e negativa nei topi non è chiara. Lo studio condotto da Schaap et al. (Schaap FG 2006) per esempio, suppone una complessa interazione tra ApoA-V e ApoC-III, che potrebbe influenzare l'attività della lipoprotein lipasi e infine i livelli di TG (Schaap FG 2006).

Sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo di ApoA-V sul metabolismo dei trigliceridi nell'uomo.

Riguardo l'associazione tra APOA5 e il colesterolo totale e LDL, le nostre osservazioni sono in accordo con studi precedenti che hanno riportato la stessa associazione in studi di GWAS (Johansen CT 2011), anche se il meccanismo alla base non è ancora chiaro.

In conclusione, i nostri dati mostrano che la variante Arg282Ser (rs778114184 G>T) nel gene APOA5 è associata a una riduzione dei livelli di trigliceridi, di colesterolo totale e LDL in bambini e adolescenti in sovrappeso/obesi, un effetto quindi presente fin dalla giovane età.

Inoltre, abbiamo osservato una riduzione significativa dei livelli di ApoA-V nei bambini eterozigoti con ridotti livelli di trigliceridi, sottolineando la relazione diretta tra i livelli di ApoA-V e i TG, come precedentemente mostrato in studi di popolazione. ApoA-V potrebbe quindi rappresentare un importante bersaglio terapeutico.

Questo lavoro è stato accettato per pubblicazione: The Arg282Ser missense mutation in APOA5 gene determines a reduction of triglyceride and LDL-cholesterol in children, together with low serum levels of apolipoprotein A-V".

**Lipids in Health and Disease in press 2017**

## **b. Resequencing del gene APLN e successiva genotipizzazione di 2 SNPs (rs181301686 e rs2281069 del gene APLN)**

### **INTRODUZIONE**

Apelina, sintetizzata come pre-apelina e poi ridotta ad un frammento più piccolo e attivo, è un peptide prodotto e secreto dal tessuto adiposo (Boucher J 2005). L'apelina, che è un'adipochina, gioca un ruolo fondamentale nella regolazione di molte funzioni, tra cui il bilancio energetico corporeo, il metabolismo glucidico, il bilancio idrico e l'autoimmunità (Deng Y 2010). In uno studio precedente, abbiamo determinato i livelli circolanti di apelina in un'ampia coorte di soggetti italiani con DT2 (n=119) e in soggetti di controllo non diabetici (n=137) e abbiamo dimostrato che i soggetti con DT2 avevano livelli di apelina significativamente più alti rispetto ai controlli e che la concentrazione di apelina era direttamente associata alla glicemia a digiuno, al BMI, al Disposition Index, all'età e alla diagnosi di DT2 (Cavallo MG 2012).

Anche Habchi et al. hanno osservato livelli aumentati di apelina nei pazienti con DT2 (Habchi M 2014). Inoltre, apelina era strettamente associata alle caratteristiche della sindrome metabolica come alti livelli di trigliceridi e basso colesterolo LDL (Altinkaya SO 2014). Infine, è stato dimostrato che alti livelli di apelina potrebbero essere un nuovo marker per la predizione del DT2 negli individui di sesso maschile (Ma WY 2014).

Il gene APLN si trova sul cromosoma X, è formato da 2 esoni codificanti ed è espresso in numerosi tessuti periferici (Klein MJ 2005; Carpené C 2007). Il gene codifica per la pre-proapelina che viene poi clivata per formare il peptide attivo (Tatemoto K 1998).

Per scoprire le varianti causali, una strategia è quella di condurre studi genetici che confrontano gli estremi di tratti quantitativi. La selezione dei campioni dagli estremi di un fenotipo dovrebbe arricchire il peso degli alleli che influenzano un tratto, migliorando così il potere statistico per scoprire le varianti di rischio e per individuare la loro associazione al tratto (Guey LT 2011; Romeo S 2007; Cohen JC 2004).

Scopo dello studio è stato identificare varianti nel gene APLN che contribuiscono a determinare i livelli plasmatici di apelina. Abbiamo ipotizzato che i polimorfismi che alterano o aumentano la

sintesi di apelina dovrebbero essere significativamente più frequenti tra gli individui con bassi livelli di apelina rispetto a quelli con livelli più alti. Visti gli effetti dei livelli di apelina sui parametri metabolici (Cavallo, 2012), il nostro secondo scopo era di analizzare la possibile associazione tra il diabete e i tratti legati al diabete e le varianti del gene APLN.

## **MATERIALI E METODI**

Abbiamo selezionato un totale di 100 soggetti, 50 per ogni estremo dei più alti e più bassi livelli sierici di apelina. Ipotesi dello studio era che i polimorfismi che alterano o incrementano la sintesi di apelina dovrebbero essere significativamente più frequenti tra gli individui con più bassi livelli di apelina rispetto a quelli con livelli più alti.

### **Popolazione I**

256 soggetti, di cui 119 affetti da DT2, con livelli circolanti di apelina noti sono stati utilizzati per lo screening delle varianti del gene APLN. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a valutazione clinica, raccolta dei dati antropometrici e di laboratorio.

### **Popolazione II**

917 soggetti obesi ( $BMI \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ ), di cui 250 con T2D sono stati reclutati presso gli ambulatori della Sapienza Università di Roma.

Sono stati raccolti i parametri clinici e di laboratorio e sono stati calcolati gli indici HOMA-IR (Modello di valutazione omeostatico di insulino resistenza) e HOMA-B (Modello di valutazione omeostatico della funzione beta-cellulare) come precedentemente mostrato da Matthews et al. (Matthews DR 1985).

### **Sequenziamento del gene**

Sono stati selezionati un totale di 100 soggetti, 50 per ogni estremo di alti e bassi livelli di apelina.

Per identificare varianti comuni del gene APLN attraverso il re-sequenziamento sono stati disegnati i primers per i due esoni codificanti (APLN ENSG00000171388).

## **Genetica**

Abbiamo selezionato i due polimorfismi rs181301686 e rs2281069 che presentavano una frequenza dell'allele minore (MAF) > 0.2 e sono stati genotipizzati nella popolazione II. Sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione BstNI per rs181301686 e StuI per rs2281069.

## **Statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego del software statistico SPSS versione 20.

Le variabili con distribuzione non normale sono state trasformate logaritmicamente prima dell'analisi.

Le variabili categoriche sono state comparate mediante test  $\chi^2$ .

Le variabili normalmente distribuite sono state valutate mediante test di Student.

## **RISULTATI**

Abbiamo disegnato uno studio di associazione genetica a 2 fasi.

Fase 1: screening iniziale di 100 individui selezionati e stratificati secondo i livelli alti e bassi di apelina e divisi in 2 gruppi uguali per identificare varianti comuni del gene APLN, seguito da un'analisi di distribuzione delle varianti tra i 2 gruppi.

Fase 2: genotipizzazione di un polimorfismo con MAF > 0.2 in 917 soggetti obesi per cercare un'associazione con il diabete o i tratti legati al diabete.

### **Step 1: screening di varianti del gene APLN**

Abbiamo eseguito un re-sequenziamento dei due esoni del gene APLN, comprese le regioni 5'-UTR e 3'-UTR in 50 soggetti con più alti livelli sierici di apelina (>1.38 ng/ml, corrispondente al 75° centile) e in 50 soggetti con più bassi livelli (<0.51 ng/ml, corrispondente al 25° centile).

Abbiamo identificato cinque polimorfismi, nessuno in regioni codificanti: rs181301686 T>C nella regione 5'-UTR 313bp a monte del codone ATG, rs2281069 T>C nella regione 5'-UTR 106bp a monte del codone ATG, un nuovo polimorfismo C>T situato all'inizio del primo introne (IVS1 + 20C), e due varianti di sequenza, rs909656 C>A e rs5977126 C>T, nella regione 3'-UTR. I polimorfismi rs181301686 e rs2281069 erano presenti sia nel gruppo con bassi livelli di apelina

sia nel gruppo con alti livelli: il polimorfismo rs181301686 è stato ritrovato in 5/100 soggetti e il polimorfismo rs2281069 in 4/100. Gli altri tre polimorfismi identificati erano rari.

### **Step 2: genotipizzazione delle varianti rs181301686 e rs2281069**

Abbiamo quindi selezionato i due polimorfismi rs181301686 e rs2281069 che presentavano una MAF > 0.2 e sono stati genotipizzati nella coorte dei 256 soggetti della popolazione I allo scopo di testare un'associazione con i livelli di apelina.

Non abbiamo osservato nessuna differenza nei livelli sierici di apelina tra i soggetti wild-type e i portatori del polimorfismo per entrambi gli SNPs:  $1.01 \pm 0.47$  vs  $1.03 \pm 0.91$  ng/ml rispettivamente,  $p=0.232$  per il polimorfismo rs181301686 e  $0.79 \pm 0.29$  vs  $1.04 \pm 0.93$  ng/ml rispettivamente,  $p=0.688$  per il polimorfismo rs2281069.

I due polimorfismi rs181301686 e rs2281069 sono risultati in forte linkage disequilibrium ( $D' = 0.976$ ) e lo SNP rs181301686 è stato selezionato per essere genotipizzato nell'intera popolazione II.

In questa popolazione la frequenza dell'allele C del polimorfismo rs181301686 era del 41%, simile alla frequenza riportata in HAPMAP-TSI (Toscani in Italia).

Le caratteristiche cliniche dei soggetti studiati, stratificati secondo il genotipo, sono mostrate in Tabella 21. Visto che i soggetti omozigoti CC erano molto pochi (14 nella nostra popolazione), i soggetti portatori del genotipo TC e CC sono stati valutati insieme rispetto ai soggetti omozigoti TT, secondo il modello dominante.

Non abbiamo osservato nessuna differenza tra i genotipi riguardo età, peso, BMI, circonferenza vita e pressione arteriosa. Non vi erano inoltre differenze significative tra i due gruppi nei parametri dell'assetto lipidico, nelle transaminasi, nella glicemia a digiuno e negli indici HOMA-IR and HOMA-B. (Tabella 21)

	GENOTIPI		P value
	TT n. = 855	TC+CC n. = 62	
<b>Sesso (M/F)</b>	595/260	50/12	n.s.
<b>Età (anni)</b>	45.1 ± 13.6	45.3 ± 14	n.s.
<b>Peso (Kg)</b>	77.2 ± 17.3	78.6 ± 21	n.s.
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	39.2 ± 9.6	38.8 ± 9.3	n.s.
<b>CV (cm)</b>	116.9 ± 19.5	112.5 ± 21.2	n.s.
<b>PAS (mm/Hg)</b>	126.4 ± 15.1	127.5 ± 14	n.s.
<b>PAD (mm/Hg)</b>	80.7 ± 11	81.2 ± 9.6	n.s.
<b>Col tot (mg/dl)</b>	199.3 ± 43.3	207.2 ± 42.5	n.s.
<b>TG (mg/dl)</b>	136.6 ± 92	132.1 ± 70.1	n.s.
<b>HDL (mg/dl)</b>	49.2 ± 13.4	52.1 ± 16.2	n.s.
<b>LDL (mg/dl)</b>	126 ± 35.9	132.1 ± 39	n.s.
<b>AST (U/L)</b>	22.4 ± 11.7	23.8 ± 12.7	n.s.
<b>ALT (U/L)</b>	29.5 ± 20.1	31.2 ± 24.7	n.s.
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	103.6 ± 36.2	103.4 ± 33.7	n.s.
<b>Insulinemia (μUI/ml)</b>	31.5 ± 25.2	27.4 ± 21.3	n.s.
<b>HOMA-IR (U)</b>	8.1 ± 7.4	7.1 ± 7.4	n.s.
<b>HOMA-B</b>	393.3 ± 347.7	323 ± 274.3	n.s.

**Tabella 21. Caratteristiche cliniche della popolazione II stratificata secondo il genotipo APLN. P-value<0.05 statisticamente significativo.**

Dato che il gene APLN si trova sul cromosoma X, abbiamo analizzato la variante anche negli uomini e nelle donne separatamente. Non abbiamo riscontrato nessuna differenza nei parametri clinici e metabolici tra i genotipi nei 2 gruppi divisi per sesso.

Abbiamo infine analizzato la distribuzione genotipica e allelica nei soggetti NGT (n= 667) e con DT2 (n=250). La frequenza dell'allele C era simile tra i 2 gruppi (27.4% vs. 27%, p=0.942 rispettivamente).

## **DISCUSSIONE**

In questo studio abbiamo testato l'ipotesi che i polimorfismi del gene dell'apelina potessero essere significativamente più comuni tra gli individui selezionati ai due estremi in base ai livelli circolanti di apelina. Abbiamo eseguito un re-sequenziamento del gene APLN in 50 soggetti con più alti livelli di apelina e 50 soggetti con livelli più bassi. Abbiamo identificato cinque polimorfismi e le 2 varianti più frequenti, entrambe con MAF > 0.2, non erano associate ai livelli circolanti di apelina.

Precedentemente, Li e collaboratori avevano eseguito un re-sequenziamento del gene in 1015 Cinesi, e avevano identificato 8 sostituzioni nucleotidiche, nessuna situata in regioni codificanti (Li WW 2009). Studi precedenti sui polimorfismi del gene APLN (non in regioni codificanti) erano stati condotti principalmente in popolazioni cinesi, e avevano mostrato associazioni con l'ipertensione (Li WW 2009; Zhang R 2012), con la glicemia a digiuno (Zhang R 2009), con il BMI (Liao YC 2011) e con la malattia coronarica (Jin W 2012).

Invece nella nostra popolazione non è stata trovata nessuna associazione tra gli SNPs del gene APLN e le caratteristiche metaboliche, incluso il diabete. Tale discordanza può essere spiegata dalla differente etnia delle popolazioni studiate.

In conclusione, abbiamo eseguito un re-sequenziamento del gene APLN in 100 soggetti stratificati per livelli di apelina, e abbiamo evidenziato 5 polimorfismi del gene in una popolazione europea, tutti a bassa frequenza. Non abbiamo riscontrato nessuna associazione tra le varianti più frequenti, il diabete gli altri tratti metabolici compresi i livelli di apelina, mostrando che nei soggetti europei il gene dell'apelina è altamente conservato e non è un determinante delle alterazioni metaboliche.

Questo lavoro è stato pubblicato: **Search for Genetic Variant in the Apelin Gene by Resequencing and Association Study in European Subjects.**  
**Genet Test Mol Biomarkers. 2016 Feb;20(2):98-102.**

### 3) STUDI AGGIUNTIVI

Come discusso nella sezione “Scopi dello Studio”, durante questo Dottorato di Ricerca ho collaborato e partecipato ad alcuni studi il cui obiettivo è stato valutare altri fattori di rischio per il DT2 e le sue complicanze, come l’infiammazione del tessuto adiposo, la presenza di grasso a livello epatico e pancreatico, e il ruolo della vitamina D nelle patologie dismetaboliche.

Di seguito una breve presentazione degli studi:

#### **i) Effetti della supplementazione orale con alte dosi di vitamina D in pazienti diabetici con NAFLD: studio monocentrico, randomizzato, in doppio cieco contro placebo**

La Steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è la causa più comune di epatopatia nel mondo e rappresenta un fattore di rischio indipendente per mortalità cardiovascolare; nei pazienti diabetici, si associa ad aumentata incidenza di complicanze micro e macrovascolari. Attualmente, non esistono terapie validate per la NAFLD.

E’ noto che la presenza di ipovitaminosi D si associa ad una maggiore prevalenza/severità della NAFLD, verosimilmente come conseguenza dell’azione anti-infiammatoria, antifibrotica e insulino sensibilizzante della vitamina D sul fegato, tuttavia l'effetto della vitamina D sulla NAFLD non è mai stato testato in uno studio controllato randomizzato (RCT).

Scopo dello studio è stato valutare l’efficacia e la sicurezza della supplementazione orale con vitamina D per 24 settimane nel ridurre il contenuto epatico di grasso (HFF) in pazienti con DT2 e NAFLD.

Questo studio randomizzato, in doppio cieco contro placebo, è stato condotto presso gli ambulatori di Diabetologia della Sapienza Università di Roma e ha previsto l’impiego di colecalciferolo 2000UI/die o placebo (1:1) per 24 settimane.

Endpoint primario: riduzione del HFF valutato con RMN; riduzione di transaminasi e Fatty Liver Index (FLI).

Endpoint secondari: miglioramento del profilo metabolico (glicemia a digiuno, HbA1c, assetto lipidico, HOMA-IR, HOMA- $\beta$ , ADIPO-IR, distribuzione del grasso corporeo) e dei parametri cardiovascolari (ABI, FMD, IMT).

E' stato osservato che la HFF e gli altri indici epatici (AST, ALT,  $\gamma$ -GT, AST/ALT e FLI) non differivano significativamente tra i due gruppi dal baseline alla 24<sup>a</sup> settimana di trattamento.

Non è stata identificata nessuna differenza statisticamente significativa negli indici di controllo metabolico (glicemia a digiuno, HbA1C, assetto lipidico), insulino-resistenza (HOMA-IR, HOMA- $\beta$ , QUICKI, FBI, FFAs), distribuzione di grasso corporeo (SAT, VAT, VAT/SAT area), PCR e parametri cardiovascolari (IMT, ABI e FMD) tra i due bracci di trattamento, dal baseline al termine dello studio.

In conclusione, la supplementazione orale con vitamina D per 24 settimane non riduce la HFF e non migliora il profilo cardiometabolico nei pazienti con DT2.

Questo lavoro è stato pubblicato: **No effects of oral vitamin D supplementation on non alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.**

**BMC Med. 2016 Jun 29;14:92.**

## **ii) Eterogeneità fenotipica associata alla disfunzione del tessuto adiposo in pazienti con diabete di tipo 2**

L'infiammazione del tessuto adiposo (AT) conduce ad un aumento dei livelli di acidi grassi liberi e alla deposizione di grasso ectopico, ma è ancora da chiarire se la disfunzione del tessuto adiposo conduce ad un accumulo selettivo di grasso in siti specifici. Lo scopo del nostro studio è stato indagare l'associazione tra disfunzione del tessuto adiposo e localizzazione di grasso in sede sottocutanea (SAT), viscerale (VAT), intraepatica e intrapancreatica e valutare il ruolo della frazione di grasso intraepatico (HFF) e intrapancreatico (PFF) nell'identificare differenti profili di rischio nei pazienti con diabete di tipo 2 (DT2).

Sono stati reclutati 65 pazienti consecutivi affetti da DT2 presso gli ambulatori di diabetologia dell'Università La Sapienza di Roma. La popolazione è stata sottoposta a valutazione clinica, esami ematici di routine, calcolo degli indici di insulino-secrezione (HOMA- $\beta$ ), insulino-resistenza (HOMA-IR) e insulino-resistenza del tessuto adiposo (ADIPO-IR). Con la Risonanza magnetica sono stati determinati SAT, VAT, HFF e PFF.

Abbiamo osservato che circa il 55.4% dei pazienti diabetici era affetto da steatosi epatica non alcolica (NAFLD); questi erano significativamente più giovani e più insulino-resistenti rispetto ai soggetti non steatosici.

Elevati valori di ADIPO-IR correlavano con la presenza di obesità, dislipidemia aterogena, aumento delle transaminasi, PCR, VAT e HOMA-IR.

L'ADIPO-IR è risultato essere il principale determinante di elevata HFF indipendentemente da sesso, età, HOMA-IR, VAT e SAT ed era in grado di predire la presenza di NAFLD severa con AUROC=0.796 per valori di ADIPO-IR  $\geq$  6.9 mmol/L $\cdot\mu$ U/mL.

L'aumento del PFF correleva con l'età e una maggiore adiposità totale (BMI,  $r=0.31$ ,  $p=0.012$ ; CV,  $r=0.30$ ,  $p=0.016$ ; area VAT,  $r=0.29$ ,  $p=0.02$ ; area SAT,  $r=0.37$ ,  $p=0.002$ ).

PFF non associava con la disfunzione del TA, il grado di insulino-resistenza, il controllo glicemico, la secrezione insulinica e la diagnosi di NAFLD.

In conclusione, l'indice ADIPO-IR è risultato in grado di predire la presenza di NAFLD indipendentemente dai classici fattori di rischio e possibili confondenti, mentre non sembra essere associato con il deposito di grasso nel pancreas. Il grado di disfunzione del TA identifica una distribuzione eterogenea di grasso ectopico associata ad un diverso profilo metabolico, e

potrebbe contribuire ad identificare profili di rischio differenti nell'ambito dei pazienti con diabete.

Questo lavoro è stato pubblicato: **Phenotypical heterogeneity linked to adipose tissue dysfunction in patients with Type 2 diabetes.**  
**Clin Sci (Lond). 2016 Oct 1;130(19):1753-62.**

**iii) Livelli aumentati di interleuchina 8 sono associati a segni di disfunzione del tessuto adiposo e a un peggiore profilo di rischio in pazienti con diabete di tipo 2.**

L'interleuchina 8 (IL-8) è una chemochina coinvolta nell'immunità sistemica, nell'infiltrazione dei macrofagi e nell'attivazione del tessuto adiposo, e potrebbe avere un ruolo nella patogenesi del diabete di tipo 2 (DT2) e nell'aterosclerosi.

Scopo di questo studio è stato valutare i livelli circolanti di IL-8 in pazienti adulti con DT2 rispetto a soggetti non diabetici e indagare le caratteristiche cliniche e biochimiche dei determinanti della concentrazione di IL-8.

Per questo studio sono stati arruolati 79 pazienti consecutivi affetti da DT2 e 37 soggetti comparabili per età, sesso e BMI come controlli. Sono stati raccolti i parametri clinici e l'anamnesi; sono stati effettuati prelievi di sangue per le analisi di routine e per il dosaggio dei livelli sierici di IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP, adiponectina e vitamina D (25(OH)D).

I pazienti diabetici mostravano livelli significativamente elevati di IL-8 rispetto ai soggetti non diabetici ( $69.27 \pm 112.83$  vs  $16.03 \pm 24.27$  pg/ml,  $p < 0.001$ ). Nei pazienti diabetici, i livelli aumentati di IL-8 correlavano con livelli più alti di IL-6 ( $p < 0.001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0.02$ ), glicemia a digiuno ( $p = 0.035$ ), HbA1c ( $p = 0.04$ ) e colesterolo LDL ( $p = 0.04$ ) e con livelli più bassi di adiponectina ( $p = 0.02$ ) e 25(OH)D ( $p = 0.003$ ).

I livelli circolanti di IL-8 sono fortemente aumentati nei pazienti con DT2 e identificano i soggetti con marcata infiammazione del tessuto adiposo, peggior profilo glicometabolico e lipidico e con livelli più bassi di vitamina D. Sono auspicabili altri studi per valutare un possibile ruolo dell'IL-8 come nuovo marcatore di stratificazione del rischio nei pazienti con DT2.

Questo lavoro è stato pubblicato: **Increased Interleukin-8 is associated with signatures of adipose tissue dysfunction and worse risk profile in subjects with type 2 diabetes**".

**Acta Diabetol. 2017 Aug 23.**

## BIBLIOGRAFIA

Abbas S, Linseisen J, Slinger T, et al. The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Jun;17(6):1339-43.

Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and meta-analysis. *Clin Chem* 2012;59:381–91

Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, et al. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 2013 Mar; 26;346:f1169.

Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010; 19:2739–2745

Al-Daghri NM, Al-Attas O, Alokail MS, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and HLA DRB1\*04 cosegregation in Saudi type 2 diabetes patients. *J Immunol* 2012;188:1325-1332.

Altinkaya SÖ, Nergiz S, Küçük M, et al. Apelin levels in relation with hormonal and metabolic profile in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 176:168-172.

Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol* 2010; 35:1385.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2015. *Diabetes Care* 2015;38 (Supplement 1).

Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1256–1264.

Arguelles LM, Langman CB, Ariza AJ, et al. Heritability and environmental factors affecting vitamin D status in rural Chinese adolescent twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:3273–81

Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5387–5391

Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Human Genetics* 1993; 92: 18-28

Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007; 167:1730–1737

Badenhoop K. Genetics: Vitamin D and type 2 diabetes mellitus--hype or hope? *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Jan;11(1):10-1.

Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet.* 2011 Sep 27;12(11):745-55.

Baz-Hecht M, Goldfine AB. The impact of vitamin D deficiency on diabetes and cardiovascular risk. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17:113–119

Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry.* 2003;42:9416–9423.

Berry D, Hypponen E. Determinants of vitamin D status: focus on genetic variations. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20:331–336

Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG, et al. Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci* 2009;63(5):187-194.

Bikle DD, Gee E, Halloran B, et al. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:954–959

Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, et al. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: A reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 969–975

Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm*. 2011;86:1–21.

Bonjour JP, Trechsel U, Granzer E, et al. The increase in skin 7-dehydrocholesterol induced by an hypocholesterolemic agent is associated with elevated 25-hydroxyvitamin D3 plasma level. *Pflugers Arch* 1987; 410:165–168

Bonnefond A, Froguel P. Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metab*. 2015 Mar; 3;21(3):357-68

Borradale D, Kimlin M. Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the 'sunshine vitamin'. *Nutr Res Rev*. 2009 Dec;22(2):118-36.

Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146:1764–1771.

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008; 29:726–776

Brandenburg VM, Vervloet MG, Marx N. The role of vitamin D in cardiovascular disease: from present evidence to future perspectives. *Atherosclerosis* 2012; 225: 253-263.

Braun A, Kofler A, Morawietz S, et al. Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochim Biophys Acta* 1993;1216:385–94

Buijsse B, Boeing H, Hirche F, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and its genetic determinants in relation to incident type 2 diabetes: a prospective case-cohort study. *Euro J Epidemiol* 2013; 28: 743–52

Brautbar A, Pompeii LA, Dehghan A, et al. A genetic risk score based on direct associations with coronary heart disease improves coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), but not in the Rotterdam and Framingham Offspring, Studies. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):421–6.

Burgaz A, Akesson A, Oster A, et al. Associations of diet, supplement use, and ultraviolet B radiation exposure with vitamin D status in Swedish women during winter. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 1399–1404

Cambuli VM, Incani M, Pilia S, et al. Oral glucose tolerance test in Italian overweight/obese children and adolescents results in a very high prevalence of impaired fasting glycaemia, but not of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25:528-534.

Carpéné C, Dray C, Attané C, et al. Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *J Physiol Biochem* 2007; 63:359-373. Review.

Carpenter TO, Zhang JH, Parra E, et al. Vitamin D binding protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers. *Bone Miner Res* 2013; 28: 213–221

Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 19–28

Cavallo MG, Sentinelli F, Barchetta I, et al. Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2012;7(12):e51236.

Chen K, DeLuca HF. Cloning of the human 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1995;1263:1-9

Cheng JB, Levine MA, Bell NH, et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:7711–7715

Chiu KC, Chuang LM, Yoon C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *BMC Med Genet* 2001;2:2.

Chiu KC, Chu A, Go VL, et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;79:820–5

Cho YS, Chen CH, Hu C, et al.; DIAGRAM Consortium; MuTHER Consortium. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nat. Genet.* 2012; 44, 67–72

Clark SA, Stumpf WE, Sar M, et al. Target cells for 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the pancreas. *Cell Tissue Res* 1980; 209:515-20

Cleve H, Constans J. The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system. *Vox Sang.* 1988;54(4):215-25.

Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, et al. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; 305:869–872.

Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72:2076–2080.

Dallinga-Thie GM, Van Tol A, Hattori H, et al; DALI study group. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006;49:1505-1511.

Dastani Z, Li R, Richards B. Genetic regulation of vitamin d levels. *Calcif Tissue Int* 2013; 92: 106–117

Davis CD, Milner JA. Vitamin D and colon cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5:67–81.

De Cosmo S, Copetti M, Lamacchia O, et al. Development and validation of a predicting model of all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Sep;36(9):2830-5.

DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev* 2008; 66:S73–S87

De Souza Santos R, Vianna LM. Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in an experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. *Clin Chim Acta*. 2005 Aug;358(1-2):146-50.

Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212:E1–E19.

Di Bonito P, Licenziati MR, Baroni MG, et al. High normal post-load plasma glucose, cardiometabolic risk factors and signs of organ damage in obese children. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:1860-1864.

DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet*. 2014 Mar;46(3):234-44.

Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):105-16.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8-F25.

Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Sep;93(9):3381-8.

Engelman CD, Meyers KJ, Iyengar SK, et al. Vitamin D intake and season modify the effects of the GC and CYP2R1 genes on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Nutr.* 2013 Jan;143(1):17-26.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-95

Fang Y, van Meurs JB, Bergink AP, et al. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1632-1641.

Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J, et al. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *AgingMale* 2008;11(3):134–139.

Flores M. A role of vitamin D in low-intensity chronic inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Nutr Res Rev* 2005;18:175–82

Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* 2008; 51, 1100–1110.

Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2005;28(5):1228–30.

Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin d levels and risk of incident hypertension. *Hypertension.* 2007; 49:1063–1069.

Forouhi NG, Luan J, Hennings S, Wareham NJ. Incidence of Type 2 diabetes in England and its association with baseline impaired fasting glucose: the Ely study 1990–2000. *Diab Med* 2007;24(2):200-7.

Forouhi NG, Ye Z, Rickard a P, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* 2012; 55: 2173–82.

Frayling TM. Genome-wide association studies provide new insight into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet* 2007; 8(9):657-62.

Garland CF, Comstock GW, Garland FC, et al. Serum 25hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet*. 1989; 2:1176–1178

Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D, calcium intake, and risk of type 2 diabetes after 5 years: results from a national, population-based prospective study (the Australian Diabetes, Obesity and Life style study). *Diabetes Care* 2011;34:1133-8.

Gagnon C, Daly RM, Carpentier A, et al. Effects of combined calcium and vitamin D supplementation on insulin secretion, insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function in multi-ethnic vitamin D-deficient adults at risk for type 2 diabetes: a pilot randomized, placebo-controlled trial. *PLoS ONE* 2014; 9, e109607

Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, et al. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet*. 2015 Dec;47(12):1415-25.

Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2008; 168:1174–1180

Gozdzik A, Zhu J, Wong BY, et al. Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):405-12.

Grandi NC, Breitling LP, Brenner H. Vitamin D and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Prev Med* 2010; 51:228–233

Grant WB, Boucher BJ. Requirements for Vitamin D across the life span. *Biol Res Nurs*. 2011;13:120–33

Grimnes G, Emaus N, Joakimsen RM, et al. Baseline serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in the Tromso Study 1994e95 and risk of developing type 2 diabetes mellitus during 11 years of follow-up. *Diabet Med* 2010; 27:1107-15.

Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the VDR gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11(12):1850–1855.

Guardiola M, Alvaro A, Vallvé JC, et al. APOA5 gene expression in the human intestinal tissue and its response to in vitro exposure to fatty acid and fibrate. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 2012;22:756-762.

Guey LT, Kravic J, Melander O, et al. Power in the phenotypic extremes: a simulation study of power in discovery and replication of rare variants. *Genet Epidemiol* 2011; 35:236-246.

Habchi M, Duvillard L, Cottet V, et al. Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 81:696-701.

Haddad JG. Plasma vitamin D-binding protein (Gc globulin): multiple tasks. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 579-582

Haddad JG, Stamp TC. Circulating 25-hydroxyvitamin D in man. *Am J Med* 1974; 57:57-62

Hanson RL, Muller YL, Kobes S, et al. A genome-wide association study in American Indians implicates DNER as a susceptibility locus for type 2 diabetes. *Diabetes* 2014; 63, 369–376

Harrison, Fauci, Braunwald, et al. 2012; “Principi di medicina interna”.

Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, et al. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol.* 1997 Sep;154 Suppl:S57-73.

Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int* 2013;92:77-98

Henneman P, Schaap FG, Havekes LM, et al. Plasma apoAV levels are markedly elevated in severe hypertriglyceridemia and positively correlated with the APOA5 S19W polymorphism. *Atherosclerosis.* 2007;193:129-134.

Hewison M. Antibacterial effects of vitamin D. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:337–45

Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, et al. Group specific component protein genotype is associated with NIDDM in Japan. *Diabetologia.* 1998 Jun;41(6):742-3.

Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, et al. Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1951–3

Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet. Med.* 2002; 4, 45–61

Hodogluligil U, Tanyolac S, Williamson DW, et al. Apolipoprotein A-V: A potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks *J. Lipid. Res.* 2006;47:144–153.

Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357:266–281.

Holick MF, Chen TC, Lu Z, et al. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (Suppl 2):V28–V33

Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1080S-6S.

Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009 Feb;19(2):73-8.

Holick MF. Vitamin D deficiency in 2010: health benefits of vitamin D and sunlight: a D-bate. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:73–5.

Horst R, Reinhardt T, Satyanarayana Reddy G. Vitamin D metabolism. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, editors. *Vitamin D*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2005; pp. 15–36

Hubacek JA, Skodová Z, Adámková V, et al. APOA5 variant Ser19Trp influences a decrease of the total cholesterol in a male 8 year cohort. *Clin. Biochem*. 2006;39:133-136.

Humphries SE, Yiannakouris N, Talmud PJ. Cardiovascular disease risk prediction using genetic information (gene scores): is it really informative? *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(2):128–32.

Hunter D, De Lange M, Snieder H, et al. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *J Bone Miner Res* 2001; 16:371–378

Hypponen E, Laara E, Reunanen A, et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001; 358:1500–1503.

Hypponen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:860–868.

Hypponen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes* 2008; 57:298-305.

Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.

International Diabetes Federation (IDF). *Diabetes atlas (e-Atlas)* [Internet]. Available from <http://www.eatlas.idf.org/index2983.html>.

Jablonski NG, Chaplin G. Colloquium paper: human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 (Suppl 2):8962–8968

Jin W, Su X, Xu M, et al. Interactive association of five candidate polymorphisms in Apelin/APJ pathway with coronary artery disease among Chinese hypertensive patients. *PLoS One* 2012; 7:e51123.

Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J. Lipid Res.* 2011;52:189-206.

John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I Epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. *National Health and Nutrition Examination Survey. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8:399–406.

Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:582S–586S

Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, et al. Polymorphisms related to the serum 25-hydroxyvitamin D level and risk of myocardial infarction, diabetes, cancer and mortality. The Tromso Study. *PLoS One* 2012; 7: e37295

Jorde R, Grimnes G. Vitamin D and health: the need for more randomized controlled trials. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 148:269-74.

Kao JT, Wen HC, Chien KL, et al. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 19:2533–2539.

Karohl C, Su S, Kumari M, et al. Heritability and seasonal variability of vitamin D concentrations in male twins. *Am J Clin Nutr.* 2010; 92:1393–8.

Khan H, Kunutsor S, Franco OH, Chowdhury R. Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc.* 2013 Feb; 72(1):89-97.

Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005; 107:198-211. Review.

Klupa T, Malecki M, Hanna L, et al. Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. *Eur J Endocrinol* 1999; 141:490–3.

Kooner JS, Saleheen D, Sim X, et al. Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2011; 43, 984–989

Kurylowicz A, Ramos-Lopez E, Bednarczuk T, Badenhoop K. Vitamin D-binding protein (DBP) gene polymorphism is associated with Graves' disease and the vitamin D status in a Polish population study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006 Jun; 114(6):329-35.

Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005; 77: 15-22

Lauridsen AL, Vestergaard P, Nexø E. Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women. *Clin Chem*. 2001; 47: 753-756

Li H, Gan W, Lu L, et al. A genome-wide association study identifies GRK5 and RASGRP1 as type 2 diabetes loci in Chinese Hans. *Diabetes* 2013; 62:291–8.

Li Y, He PP, Zhang DW, et al. Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014; 237:597–608.

Li WW, Niu WQ, Zhang Y, et al. Family-based analysis of apelin and AGTRL1 gene polymorphisms with hypertension in Han Chinese. *J Hypertens* 2009; 27:1194–1201.

Liao YC, Chou WW, Li YN, et al. Apelin gene polymorphism influences apelin expression and obesity phenotypes in Chinese women. *Am J Clin Nutr* 2011; 94:921-928.

Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Aug;25(4):585-91.

Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone* 2002; 30:771–777

Liu E, Meigs JB, Pittas AG, et al. Predicted 25-hydroxyvitamin D score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr*. 2010 Jun;91(6):1627-33

Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 2009; 41:82-88.

Lyssenko V, Laakso M. Genetic screening for the risk of type 2 diabetes: worthless or valuable? *Diabetes Care*. 2013 Aug;36 Suppl 2:S120-6.

Ma RCW, Hu C, Tam CH, et al. Genome-wide association study in a Chinese population identifies a susceptibility locus for type 2 diabetes at 7q32 near PAX4. *Diabetologia* 2013; 56, 1291–1305.

Ma WY, Yu TY, Wei JN, et al. Plasma apelin: A novel biomarker for predicting diabetes. *Clin Chim Acta* 2014; 435:18-23.

Malecki MT, Klupa T, Wanic K, et al. Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a polish population. *Diabetes Res Clin Prac* 2002;57:99–104.

Malecki MT, Frey J, Moczulski D, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111:505–509.

Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2010 Feb;7(2):111-8.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct; 8;461(7265):747-53

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 2008 Mar;24(3):133-41.

Martinez ME, Giovannucci EL, Colditz GA, et al. Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:1375–1382.

Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*. 2007 Jun 11;167(11):1159-65.

Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 1247-1257.

Mathieu C. Vitamin D and diabetes: where do we stand? *Diabetes Res Clin Pract* 2015;108:201-9.

Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462-1470.

Mattila C, Knekt P, Männistö S, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and subsequent risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Oct;30(10):2569-70.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412–419.

McEwen LN, Karter AJ, Waitzfelder BE, et al. Predictors of mortality over 8 years in type 2 diabetic patients: Translating Research Into Action for Diabetes (TRIAD). *Diabetes Care*. 2012 Jun;35(6):1301-9.

McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 471–477

Melamed ML, Muntner P, Michos ED, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease: results from NHANES 2001 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jun;28(6):1179-85.

Melegh BI, Duga B, Sümegi K, et al. Mutations of the apolipoprotein A5 gene with inherited hypertriglyceridaemia: review of the current literature. *Curr. Med. Chem*. 2012;19:6163–6170.

Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, et al. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab*. 2012;61(4):337-48.

Michos ED, Melamed ML. Vitamin D and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; 11:7–12.

Millen AE, Wactawski-Wende J, Pettinger M, et al. Predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among postmenopausal women: the Women's Health Initiative Calcium plus Vitamin D clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:1324–35

Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, Pittas AG. "Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic  $\beta$  cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus". *Am J Clin Nutr*. 2011 Aug;94(2):486-94.

Mitsubishi T, Morris Jr RC, Ives HE. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;87:1889-95

Monticeli OA, Teixeira Tde M, Chies JA, et al. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2012 Oct;31(10):1411-21.

Morris JG. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol- $\Delta^7$ -reductase. *J Nutr* 1999; 129:903–908

Morrison AC, Bare LA, Chambless LE, et al. Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 2007;166(1):28–35.

Mulligan ML, Felton SK, Riek AE, Bernal-Mizrachi C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 May;202(5):429.e1-9.

Muscogiuri G, Sorice GP, Ajjan R, et al. Can vitamin D deficiency cause diabetes and cardiovascular diseases? Present evidence and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:81-7.

Muscogiuri G, Mitri J, Mathieu C, et al. Mechanisms in endocrinology: vitamin D as a potential

contributor in endocrine health and disease. *Eur J Endocrinol.* 2014 Sep;171(3):R101-10.

Neyestani TR, Djazayeri A, Shab-Bidar S, et al. Vitamin D Receptor Fok-I polymorphism modulates diabetic host response to vitamin D intake: need for a nutrigenetic approach. *Diabetes Care* 2013;36(3):550-556.

Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis.* 2011;219:15–21.

Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One* 2012;7:e52171.

Nissen J, Vogel U, Ravn-Haren G, et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes are both determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations after UVB irradiation and after consumption of vitamin D<sub>3</sub>-fortified bread and milk during winter in Denmark. *Am J Clin Nutr.* 2015 Jan;101(1):218-27.

Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science.* 1980 Aug 15;209(4458):823-5.

Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 2002; 51:356–359.

Orton SM, Morris AP, Herrera BM, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):441-7.

Palmer ND, McDonough CW, Hicks PJ, et al.; DIAGRAM Consortium; MAGIC Investigators A genome-wide association search for type 2 diabetes genes in African Americans. *PLoS ONE* 7, 2012; e29202

Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2008 Mar;10(3):185-97.

Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol* 2009; 133:276–281.

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001;294:169-173.

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum. Mol. Genet*. 2002;11:3031-3038.

Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6:621–630.

Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol* 2011; 75:575–584

Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2017-29.

Poole KE, Loveridge N, Barker PJ, et al. Reduced vitamin D in acute stroke. *Stroke*. 2006 Jan;37(1):243-5.

Pozzilli P, Manfrini S, Crinò A, et al.; IMDIAB group. Low Levels of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. *Horm Metab Res*. 2005 Nov;37(11):680-3.

Priehl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013 Jul 5;5(7):2502-21

Qi L, Cornelis MC, Kraft P, et al. Genetic variants at 2q24 are associated with susceptibility to type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19, 2706–2715

Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, et al. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007 Nov;23(8):631-6.

Ren W, Zhang SH, Wu J, et al. Research of amino acid variants of the vitamin D binding globulin in type 2 diabetes family. *Chin J Prev Med* 2003;37:202–3.

Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S, Thompson A, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med.* 2011 Mar 3;364(9):829-841.

Roglic G, Unwin N, Bennett PH, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care.* 2005 Sep;28(9):2130-5.

Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet* 2007; 39:513–516.

Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, et al. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Rev* 2012; 33: 456–92

Rossi M, Federico G, Corso G, et al. Vitamin D status in patients affected by Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28:69–80

Russell PJ et al. "Genetica" 2010.

Safadi FF, Thornton P, Magiera H, et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* 1999; 103:239–251

Saijo T, Ito M, Takeda E, et al. A unique mutation in the vitamin-D receptor gene in 3 Japanese patients with vitamin-D dependent rickets type-2 — utility of single-strand conformation

polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet* 1991;49 (3):668–673.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Saxena R, Saleheen D, Been LF, et al. Genome-wide association study identifies a novel locus contributing to type 2 diabetes susceptibility in Sikhs of Punjabi origin from India. *Diabetes* 2013; 62, 1746–1755

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007 Jun 1;316(5829):1331-6.

Schaap FG, Nierman MC, Berbée JF, et al. Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res*. 2006;47:2333-2339.

Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1814:186–199

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007; 316, 1341–1345

Scragg R, Sowers M, Bell C; Third National Health and Nutrition Examination Survey. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 2004 Dec;27(12):2813-8.

Scragg R. Vitamin D and public health: an overview of recent research on common diseases and mortality in adulthood. *Public Health Nutr*. 2011;14:1515–32

Seida JC, Mitri J, Colmers IN, et al. Clinical review: effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:3551-60.

Sentinelli F, Bertocchini L, Barchetta I, et al. The vitamin D receptor (VDR) gene rs11568820 variant is associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion in Italian adult subjects, and associates with increased cardio-metabolic risk in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016 May;26(5):407-13

Shao XJ, Miao H, Jiang XQ, et al. Association of vitamin D binding protein receptor gene polymorphism and risk of type 2 diabetes mellitus in Han people of Nanjing Province. *Chin J Mod Med* 2012;22:45–8.

Shea MK, Booth SL, Massaro JM, et al. Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol.* 2008 Feb 1;167(3):313-20.

Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, et al. Genetic and nongenetic correlates of vitamins K and D. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63:458–464

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26:1135-1145

Signorello LB, Shi J, Cai Q, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011; 6: e28623

Simpson RU, Thomas GA, Arnold AJ. Identification of 1,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and activities in muscle. *J Biol Chem* 1985;260:8882-91.

Sinotte M, Diorio C, Berube S, et al. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:634–40

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007 Feb; 22;445(7130):881-5.

Sluiter WJ, Erkelens DW, Reitsma WD, Doorenbos H. Glucose tolerance and insulin release, a mathematical approach I. Assay of the beta-cell response after oral glucose loading. *Diabetes* 1976; 25:241-244.

Smith JA, Ware EB, Middha P, et al. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Subclinical Phenotypes. *Curr Epidemiol Rep.* 2015;2(3):180-190.

Snellman G, Melhus H, Gedeberg R, et al. Seasonal genetic influence on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a twin study. *PLoS ONE.* 2009;4:e7747

Song Y, Wang L, Pittas AG, et al. Blood 25-hydroxy vitamin D levels and incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care.* 2013 May;36(5):1422-8.

Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, et al. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta* 2006; 372:33–42

St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:225-30

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet* 2008; 28;371(9631):2153-6

Tabassum R, Chauhan G, Dwivedi OP, et al. Genome-wide association study for type 2 diabetes in Indians identifies a new susceptibility locus at 2q21. *Diabetes* 2013; 62, 977–986

Talmud PJ, Cooper JA, Hattori H, et al. The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Northwick Park Heart Study II. *Diabetologia.* 2006;49:2337-2340.

Talmud PJ, Hingorani AD, Cooper JA, et al. Utility of genetic and non-genetic risk factors in prediction of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *BMJ* 2010;340:b4838.

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 251:471–476.

Thanassoulis G. Mendelian randomization: how genetics is pushing the boundaries of epidemiology to identify new causes of heart disease. *Can J Cardiol.* 2013 Jan;29(1):30-6.

Thorne-Lyman A, Fawzi WW. Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2012 Jul;26 Suppl 1:75-90.

Tint GS, Irons M, Elias ER, et al. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med* 1994; 330:107–113.

Trang HM, Cole DE, Rubin LA, et al. Evidence that vitamin D<sub>3</sub> increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D<sub>2</sub>. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:854–858

Triunfo S, Lanzone A, Lindqvist PG. Low maternal circulating levels of vitamin D as potential determinant in the development of gestational diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest.* 2017 May 29

Triunfo S, Lanzone A. Potential impact of maternal vitamin D status on obstetric well-being. *J Endocrinol Invest* 2016; 39: 37-44

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004 Sep 1;338(2):143-56.

Vaessen SF, Schaap FG, Kuivenhoven JA, et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res.* 2006;47:2064-2070.

Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: the odd couple. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Nov;24(11):561-8.

Van der Schueren BJ, Verstuyf A, Mathieu C. Straight from DHeart: vitamin D status and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012; 23: 17-23.

Van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 2001;27:644512–644520.

Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;295:1156-1159.

Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25- dihydroxyvitaminD3 receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000;374:334-8.

Vimaleswaran KS, Berry DJ, Lu C, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS Med.* 2013;10(2):e1001383.

Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al; MAGIC investigators; GIANT Consortium. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010 Jul;42(7):579-89.

Vu D, Sakharkar P, Tellez-Corrales E, et al. Association of vitamin D binding protein polymorphism with long-term kidney allograft survival in Hispanic kidney transplant recipients. *Mol Biol Rep.* 2013 Feb;40(2):933-9.

Wang CJ, Li LL, Wang L, et al. Evaluating the risk of type 2 diabetes mellitus using artificial neural network: an effective classification approach. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;100:111–18

Wang G, Li Y, Li L, et al. Association of the vitamin D binding protein polymorphisms with the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *BMJ Open*. 2014 Nov; 4;4(11):e005617.

Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008 Jan 29;117(4):503-11.

Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180–88

Webb AR. Who, what, where and when-influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92:17–25.

Wells BJ, Jain A, Arrigain S, et al. Predicting 6-year mortality risk in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008 Dec;31(12):2301-6.

Wimalawansa SJ. Associations of vitamin D with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Sep; 20.

Wjst M, Altmuller J, Faus-Kessler T, et al. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res* 2006; 7: 60

Wjst M, Altmuller J, Braig C, et al. A genome-wide linkage scan for 25-OHD(3) and 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> serum levels in asthma families. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:799–802

Yamamoto H, Miyamoto K, Li B, et al. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J Bone Miner Res* 1999; 14:240–247.

Yang X, So WY, Tong PC, et al. Hong Kong Diabetes Registry. Development and validation of an all-cause mortality risk score in type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 2008; 168:451-457.

Ye WZ, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, et al. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *Metabolism* 2001;50:366–9.

Ye Z, Sharp SJ, Burgess S, et al. Association between circulating 25-hydroxyvitamin D and incident type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015 Jan;3(1):35-42.

Yu F, Cui LL, Li X, et al. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016;25(3):614-624.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science.* 2007 Jun 1;316(5829):1336-41.

Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):638-45.

Zhang R, Hu C, Wang CR, et al. Association of apelin genetic variants with type 2 diabetes and related clinical features in Chinese Hans. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122:1273–1276.

Zhang R, Lu J, Hu C, et al. Associations of common variants at APLN and hypertension in Chinese subjects with and without diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012:917496.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):782-7.

Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2008; 93:512–517

Zoppini G, Galletti A, Targher G, et al. Glycatedhaemoglobin is inversely related to serum vitamin D levels in type 2 diabetic patients. PLoS One. 2013 Dec 16;8(12):e82733.

## **PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE SU RIVISTE INTERNAZIONALI DERIVANTI DAL PROGETTO DI DOTTORATO**

### **a) PUBBLICAZIONI SPECIFICHE DEL PROGETTO DI DOTTORATO**

1. The vitamin D receptor functional variant rs2228570 (C>T) does not associate with type 2 diabetes mellitus.

**Bertocchini L**, Sentinelli F, Leonetti F, Bailetti D, Capoccia D, Cimini FA, Barchetta I, Incani M, Lenzi A, Cossu E, Cavallo MG, Baroni MG.

Endocr Res. 2017 Apr 7:1-5.

2. The vitamin D receptor (VDR) gene rs11568820 variant is associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion in Italian adult subjects, and associates with increased cardio-metabolic risk in children.

Sentinelli F, **Bertocchini L**, Barchetta I, Capoccia D, Incani M, Pani MG, Loche S, Angelico F, Arca M, Morini S, Manconi E, Lenzi A, Cossu E, Leonetti F, Baroni MG, Cavallo MG.

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2016 May;26(5):407-13.

3. The Arg282Ser missense mutation in APOA5 gene determines a reduction of triglyceride and LDL-cholesterol in children, together with low serum levels of apolipoprotein A-V".

**Bertocchini L**, Sentinelli F, Incani M, Bailetti D, Cimini FA, Barchetta I, Cavallo MG, Cossu E, Lenzi A, Loche S, Baroni MG.

Lipids in Health and Disease in press 2017

4. The "Sapienza University Mortality and Morbidity Event Rate (SUMMER) study in diabetes": Study protocol.

Barchetta I, Capoccia D, Baroni MG, Buzzetti R, Cavallo MG, De Cosmo S, Leonetti F, Leotta S, Morano S, Morviducci L, Prudente S, Pugliese G, Trischitta V, SUMMER Study in Diabetes Group.

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2016 Feb;26(2):103-8.

5. Search for Genetic Variant in the Apelin Gene by Resequencing and Association Study in European Subjects.

Sentinelli F, Capoccia D, **Bertoccini L**, Barchetta I, Incani M, Coccia F, Manconi E, Lenzi A, Cossu E, Leonetti F, Cavallo MG, Baroni MG.

Genet Test Mol Biomarkers. 2016 Feb;20(2):98-102.

6. MODY: quando diagnosticarlo.

**Bertoccini L**, Baroni MG.

SIE, Società Italiana Endocrinologia. 23-05-2016.

(<http://www.societaitalianadiendocrinologia.it/html/news/Mody-quando-diagnosticarlo.asp>)

L'Endocrinologo, volume 18, suppl. 1, Giugno 2017

## **b) PUBBLICAZIONI DERIVANTI DA ALTRI STUDI COLLABORATIVI**

7. TSH levels are associated with vitamin D status and seasonality in an adult population of euthyroid adults.

Barchetta I, Baroni MG, Leonetti F, De Bernardinis M, **Bertoccini L**, Fontana M, Mazzei E, Fraioli A, Cavallo MG.

Clin Exp Med. 2015 Aug;15(3):389-96.

8. Therapy with proton pump inhibitors in patients with type 2 diabetes is independently associated with improved glycometabolic control.

Barchetta I, Guglielmi C, **Bertoccini L**, Calella D, Manfrini S, Secchi C, Pozzilli P, Cavallo MG; IMDIAB group.

Acta Diabetol. 2015 Oct;52(5):873-80.

9. Transmembrane-6 superfamily member 2 (TM6SF2) E167K variant increases susceptibility to hepatic steatosis in obese children.

Mancina RM, Sentinelli F, Incani M, **Bertoccini L**, Russo C, Romeo S, Baroni MG.

Dig Liver Dis. 2016 Jan;48(1):100-1.

10. Increased circulating osteopontin levels in adult patients with type 1 diabetes mellitus and association with dysmetabolic profile.

Barchetta I, Alessandri C, **Bertoccini L**, Cimini FA, Taverniti L, Di Franco M, Fraioli A, Baroni MG, Cavallo MG.

Eur J Endocrinol. 2016 Feb;174(2):187-92.

11. The Perilipin 2 (PLIN2) gene Ser251Pro missense mutation is associated with reduced insulin secretion and increased insulin sensitivity in Italian obese subjects.

Sentinelli F, Capoccia D, Incani M, **Bertoccini L**, Severino A, Pani MG, Manconi E, Cossu E, Leonetti F, Baroni MG.

Diabetes Metab Res Rev. 2015 Oct 7.

12. No effects of oral vitamin D supplementation on non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

Barchetta I, Del Ben M, Angelico F, Di Martino M, Fraioli A, La Torre G, Saulle R, Perri L, Morini S, Tiberti C, **Bertoccini L**, Cimini FA, Panimolle F, Catalano C, Baroni MG, Cavallo MG.

BMC Med. 2016 Jun 29;14:92.

13. Phenotypical heterogeneity linked to adipose tissue dysfunction in patients with Type 2 diabetes.

Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Di Martino M, Cimini FA, **Bertoccini L**, Polimeni L, Catalano C, Fraioli A, Del Vescovo R, Morini S, Baroni MG, Cavallo MG.

Clin Sci (Lond). 2016 Oct 1;130(19):1753-62.

14. Comment on Elangovan H et al. vitamin D in liver disease: Current evidence and potential directions.

Barchetta I, Del Ben M, Angelico F, Di Martino M, Fraioli A, La Torre G, Saulle R, Perri L, Morini S, Tiberti C, **Bertoccini L**, Cimini FA, Panimolle F, Catalano C, Baroni MG, Cavallo MG.

Biochim Biophys Acta. 2017 May 1;1863(9):2388.

15. Relationship between adipose tissue dysfunction, vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.

Cimini FA, Barchetta I, Carotti S, **Bertoccini L**, Baroni MG, Vespasiani-Gentilucci U, Cavallo MG, Morini S.

World J Gastroenterol. 2017 May 21;23(19):3407-3417.

16. Increased Interleukin-8 is associated with signatures of adipose tissue dysfunction and worse risk profile in subjects with type 2 diabetes". Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, Mainiero F, Costantino C, **Bertoccini L**, Morini S, Baroni MG, Lenzi A, Cavallo MG.

Acta Diabetol. 2017 Aug 23.

## **ABSTRACTS (comunicazioni orali e/o poster con discussione) DERIVANTI DAL PROGETTO DI DOTTORATO**

1. **Bertoccini L**, Barchetta I, Calella D, Costantino C, De Bernardinis M, Gangitano E, Cimini FA, Caroli A, Brunotti G, Cavallo MG .

PPIs Therapy is associated with better glyceemic control in patients affected by type 2 Diabetes Mellitus.

**Poster con discussione.** Congresso della Società Italiana di Medicina Interna (SIMI), Ottobre 2014, Roma.

2. Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Di Martino M, Cimini FA, **Bertoccini L**, Catalano C, Fraioli A, Morini S, Baroni MG, Cavallo MG.

Eterogeneità fenotipica associata alla disfunzione del tessuto adiposo in pazienti con diabete di tipo 2.

26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2016, Rimini

3. **Bertoccini L**, Sentinelli F, Alessi E, Bagella F, Basile G, Fillardi T, Pibiri C, D'Angelo P, Pezzilli S, Leanza G, Di Folco U, Mastino D, Piscitelli P, Baroni MG.  
Analisi dei geni coinvolti nel metabolismo della Vitamina D e Diabete di tipo 2.  
**Comunicazione orale.** 26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2016, Rimini
  
4. Sentinelli F, **Bertoccini L**, Barchetta I, Capoccia D, Cimini FA, Incani M, Pani MG, Loche S, Leonetti F, Lenzi A, Cossu E, Cavallo MG, Baroni MG.  
Il polimorfismo rs11568820 del gene del recettore della Vitamina D (VDR) è associato con Diabete di tipo 2 (DT2) e con alterata secrezione insulinica in adulti italiani e con un aumentato rischio cardiometabolico in bambini.  
26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2016, Rimini
  
5. Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, **Bertoccini L**, Mainiero F, Cavallo MG.  
Elevati livelli sierici di interleuchina-8 in adulti affetti da Diabete mellito di tipo 2.  
26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2016, Rimini
  
6. Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Di Martino M, Fraioli A, La Torre G, Morini S, Tiberti C, **Bertoccini L**, Cimini FA, Del Vescovo R, Catalano C, Baroni MG, Cavallo MG.  
Effetti della supplementazione orale con alte dosi di Vitamina D in pazienti diabetici con NAFLD: studio monocentrico, randomizzato, in doppio cieco contro placebo.  
26° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2016, Rimini
  
7. **Bertoccini L**, Sentinelli F, Incani M, Cossu E, Pani MG, Loche S, Cimini FA, Barchetta I, Bailetti D, Cavallo MG, Baroni MG.  
La variante non sinonima Arg282Ser (rs778114184 G>T) del gene ApoA5 si associa a ridotti livelli di trigliceridi e di LDL-colesterolo in età evolutiva.  
**Comunicazione orale.** Riunione Annuale del Gruppo di Ricerca "Diabete e Aterosclerosi", Febbraio 2017, Bologna
  
8. Cimini FA, **Bertoccini L**, Sentinelli F, Incani M, Rosignolo F, Serafini C, Satta C, Frongia P, Riccardi R, Ripoli C, Soro M, Mureddu A, Barchetta I, Cavallo MG, Baroni MG, Cossu E.

Valutazione dei livelli circolanti di miR-375 nel Diabete di Tipo 1: nuovo marcatore di danno  $\beta$ -cellulare nel processo autoimmune?

XXI Congresso Nazionale AMD, Maggio 2017, Napoli

9. **Bertocchini L**, Sentinelli F, Incani M, Bailetti D, Cimini FA, Barchetta I, Cavallo MG, Cossu E, Lenzi A, Loche S, Baroni MG.

The Arg282Ser missense mutation in APOA5 gene determines a reduction of triglyceride and LDL-cholesterol in children, together with low serum levels of Apolipoprotein A-V

**Poster con discussione.** 39° congresso SIE, Giugno 2017, Roma

10. Bailetti D, Sentinelli F, **Bertocchini L**, Di Costanzo A, Arca M, Prudente S, Baroni MG.

Deep re-sequencing of 9 Type 2 Diabetes GWAS *loci* by comparison of the extremes of dynamic indices of insulin secretion (i.e. Disposition Index)

39° congresso SIE, Giugno 2017, Roma