All. "2"

- 3 APR. 2014

ASLCagliari

OSPEDALE MICROCITEMICO
SERVIZIO DI ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
Responsabile: Dr. Sandro Loche

AZIENDA U.S.L. n. 8 - CAGLIARI
Pianificazione - Controllo Strategico
Qualità e Risk Management
15 GIU. 2010
ARRIVATA

Cagliari, 15/06/2010

Prot. 75/2010

Oggetto: progetto di ricerca sanitaria finalizzata "Identificazione dei fattori di rischio genetici per l'obesità" – Bando 2005 R.A.S. Assessorato dell'Igiene e Sanità e dell'Assistenza Sociale – Relazione Finale

E' noto che nella patogenesi della forma comune di obesità siano coinvolti sia fattori genetici che ambientali. Finora sono stati identificati numerosi geni/loci potenzialmente implicati. Polimorfismi vicini o dentro questi geni sono stati trovati associati con l'indice di massa corporea (BMI) e/o con altre caratteristiche fenotipiche legate all'obesità. L'effetto di alcune varianti geniche è stato confermato in diverse popolazioni (come ad esempio per i geni *FTO* e *MC4R*), mentre il coinvolgimento di altre varianti (ad esempio per i geni *INSIG2* ed *INS*) è ancora controverso, forse a causa della eterogeneità e/o del modesto effetto genetico. Poiché la maggior parte dei risultati di associazione deriva da studi effettuati su popolazioni generali, questi dati richiedevano di essere testati in individui selezionati per il fenotipo obeso. Inoltre, la scelta di una popolazione geneticamente isolata come quella sarda risultava particolarmente importante, permettendo di ridurre l'eterogeneità genetica e di svelare la presenza di effetti genetici maggiori. Scopo del nostro studio è stato quello di testare l'associazione di varianti ai geni *FTO*, *INSIG2* ed *INS* in una coorte di bambini e adolescenti obesi sardi.

Lo studio è stato dunque condotto in un campione di 763 bambini e adolescenti obesi sardi (359 maschi e 404 femmine, di età media 11.0 ± 3.3 DS) afferenti al Servizio di Endocrinologia Pediatrica del PO Microcitemico, ed in un gruppo di 548 controlli

16.06.10
x Rendicontazione progetto

via Jenner, 09121 Cagliari
Responsabile 070-6095657
Ambulatori 070-6095536 - 6095652 - Laboratorio 070-6095682 - 6095658
Fax 070-6095657 e-mail endoped@tiscali.it

sani della stessa popolazione con BMI normale. I campioni erano tutti indipendenti fra loro. Il DNA è stato purificato da linfociti di sangue intero periferico mediante estrazione salina.

Sono stati genotipizzati SNPs (Polimorfismi a Singolo Nucleotide) localizzati vicino o all'interno dei geni *INS*, *INSIG2* ed *FTO*, rispettivamente rs689, rs7566605 ed rs9939609.

Per quanto riguarda il gene *INS*, l'analisi statistica effettuata sui genotipi non ha evidenziato alcuna differenza significativa fra le frequenze alleliche di pazienti e controlli per il polimorfismo rs689, che nella nostra casistica non risulta pertanto associato con un aumento di BMI.

Anche nel caso del gene *INSIG2* non abbiamo riscontrato differenze significative nella distribuzione delle frequenze alleliche tra pazienti e controlli. Dati di letteratura suggerivano però un possibile coinvolgimento del gene nell'omeostasi del glucosio. Così abbiamo deciso di testare all'interno della casistica di obesi, l'associazione dello SNP rs7566605 anche con le concentrazioni di glucosio ed insulina e con un parametro che permette di misurare la resistenza insulinica, HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance). Le analisi condotte ci hanno permesso di confermare un'associazione tra varianti alleliche del gene *INSIG2* e la concentrazione sierica di glucosio, di insulina e di conseguenza un'associazione con l'HOMA-IR, sebbene dopo correzione per sesso ed età solo la prima associazione risulti ancora significativa. Questa osservazione ci ha suggerito di controllare le frequenze alleliche nel sottogruppo di pazienti con IFG (impaired fasting glucose) e/o IGT (impaired glucose tolerance), riscontrando con maggior chiarezza il risultato di associazione già emerso nell'intera casistica di obesi. In conclusione, sebbene il polimorfismo rs7566605 non abbia mostrato nelle diverse popolazioni un'associazione consistente con l'aumento di BMI, i

risultati del nostro studio suggerirebbero un ruolo del gene *INSIG2* nella patogenesi dell'obesità mediato dai suoi effetti sul metabolismo glucidico.

Una chiara associazione con l'obesità è stata invece evidenziata anche nella nostra casistica per il polimorfismo rs9939609 del gene *FTO*. L'allele A di predisposizione ha mostrato infatti una frequenza allelica pari al 55% negli obesi contro il 43% nei controlli [Odds ratio = 1.6 (1.4-1.9), $p = 5.1 \times 10^{-10}$], ovvero un individuo omozigote per la variante di predisposizione ha un rischio di diventare obeso 2.5 volte superiore rispetto ad un individuo il cui genotipo non presenti alcun allele di predisposizione a questo locus.

L'entità di un effetto genetico di predisposizione all'obesità come quello appena descritto, è sicuramente la più alta ad oggi riscontrata in tutte le popolazioni testate. Rimane però un effetto genetico di modesta entità, come quasi tutti quelli che sottendono ai cosiddetti disordini multigenici e multifattoriali, svelabile quindi solo con studi estesi a casistiche molto ampie. Negli ultimi anni il rapido sviluppo delle biotecnologie ha reso possibile identificare effetti genetici modesti, soprattutto mediante studi di associazione caso-controllo estesi all'intero genoma (Genome Wide Association), in larghe casistiche di pazienti e controlli. L'applicazione di tali tecnologie comporta però un enorme dispendio economico. Nel nostro studio abbiamo voluto testare l'utilizzo delle tecnologie più all'avanguardia su pool di campioni opportunamente selezionati per purezza e qualità di DNA genomico, quantizzati mediante raffinate metodiche basate su intercalanti del DNA fluorescenti. Un simile approccio consente di abbattere tremendamente i costi poiché tratta centinaia di campioni come se si trattasse di un unico campione. Abbiamo quindi allestito un pool di 420 DNA di bambini e adolescenti obesi ed un pool di 420 DNA di individui di controllo (tutti già genotipizzati per il singolo locus rs9939609 del gene *FTO*) ed utilizzato questi campioni per uno

✉ via Jenner, 09121 Cagliari
☎ Responsabile 070-6095657
Ambulatori 070-6095536 - 6095652 - Laboratorio 070-6095682 - 6095658
Fax 070-6095657 e-mail endoped@tiscali.it

studio di GWA mediante una tecnologia basata su chip. Dall'analisi dei dati di fluorescenza ottenuti da questo esperimento abbiamo potuto constatare che il risultato di associazione caso-controllo osservato in questa casistica per il gene *FTO* è pari alle attese calcolate in base alle precedenti genotipizzazioni dei singoli soggetti. Pertanto possiamo concludere che effetti genetici genuini di tale entità (sebbene modesta, ma comunque elevata per un tratto complesso) sono svelabili anche con un esperimento di pooling allestito correttamente, abbattendo i costi di un progetto di centinaia di volte.

I risultati dello studio sono stati presentati in alcuni congressi, un lavoro è in stampa ed alcuni altri sono in fase di preparazione.

1. Loche A., Zavattari P., Pilia S., Civolani P., Marras V., Cucca F. and Loche S: Association study for *FTO*, *insulin* and *INSIG2* gene variants with childhood obesity in Sardinia. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting, Washington DC, USA, 10-13 June 2009.
2. Zavattari P., Loche A., Pilia S., Civolani P., Casini M.R., Moi L., Cucca F. and Loche S: Allelic variants of *INSIG2* gene are associated with glucose concentrations and HOMA-IR but not with BMI in Sardinian obese children and adolescents. LWPES/ESPE 8th Joint Meeting, New York, USA 9-12 Sep 2009.
3. Zavattari P., Loche A., Civolani P., Pilia S., Casini M.R., Carta D., Porcu M., Uccheddu A.P., Loche S. Studio di associazione dei geni *FTO* ed *INSIG2* con l'obesità in bambini e adolescenti sardi. 1° Workshop Regionale Sardo degli Assegnisti di Ricerca, WORSAR 2009. Cagliari, 24-25 Settembre 2009.
4. Loche A., Zavattari P., Pilia S., Civolani P., Casini M.R., Carta D., Porcu M., Uccheddu A.P., Loche S. Studio di associazione dei geni *FTO*, *INS* ed *INSIG2* con l'obesità in bambini e adolescenti sardi. XVII° Congresso Nazionale SIEDP. Napoli, 5-7 Novembre 2009.

✉ via Jenner, 09121 Cagliari
☎ Responsabile 070-6095657
Ambulatori 070-6095536 - 6095652 - Laboratorio 070-6095682 - 6095658
Fax 070-6095657 e-mail endoped@tiscali.it

5. Zavattari P., Loche A., Civolani P., Pilia S., Moi L., Casini M.R., Minerba L., Loche S: An INSIG2 polymorphism affects glucose homeostasis in Sardinian obese children and adolescents. *Annals of Human Genetics.* In press.

Il Responsabile Scientifico
Dr. Sandro Loche

ALLEGATO ALLA DELIBERAZIONE
N. 406 DEL - 3 APR. 2014
IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO (Dott. Sergio Salis)
IL DIRETTORE SANITARIO (Dott. Ugo Storelli)
IL DIRETTORE GENERALE (Dott. Emilio Simeone)

Il presente allegato è composto da n° 05 fogli di n° 05 pagine.

via Jenner, 09121 Cagliari
Responsabile 070-6095657
Ambulatori 070-6095536 - 6095652 - Laboratorio 070-6095682 - 6095658
Fax 070-6095657 e-mail endoped@tiscali.it