



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dottorato di Ricerca in Malattie Genetiche dell'Età Evolutiva

Dott.ssa GIOVANNA VALENTI

**LA VARIANTE G -308 A *TNF- α* QUALE FATTORE DI RISCHIO PER
L'OBESITA' E MODIFICATORE D'EFFETTO DEL PROFILO LIPIDICO
E DEI *MARKER* INFIAMMATORI**

—————
Tesi di Dottorato di Ricerca
—————

Tutor

Chiar.ma Prof.ssa Antonella Agodi

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Teresa Mattina

XXIV Ciclo
Triennio 2009-2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA GENETICA	1
1.1.1 L'epidemiologia molecolare	2
1.1.2 Epidemiologia del Genoma Umano	5
1.1.3 Marcatori molecolari in epidemiologia	8
1.1.4 I polimorfismi genetici e i metodi per evidenziarli	12
1.2 LA GENETICA DI POPOLAZIONE	15
1.3 NUTRIGENOMICA E NUTRIGENETICA	17
1.3.1 Interazione gene-ambiente nelle malattie dell'uomo	19
1.4 SISTEMA HLA: CARATTERISTICHE GENETICHE E FUNZIONI	23
1.4.1 L'aplotipo ancestrale 8.1	25
1.5 IL GENE <i>TNF ALFA</i> ED I SUOI POLIMORFISMI	30
1.5.1 Il gene <i>TNFα</i> e l'acne <i>vulgaris</i>	33
1.6 LA SALUTE RIPRODUTTIVA	35
1.6.1 Il ruolo della donna nella sana alimentazione	37
1.6.2 I fabbisogni nutrizionali delle donne in età fertile	38
1.7 L'OBESITA' COME MALATTIA MULTIFATTORIALE	40
1.7.1 Le alterazioni lipidiche nella popolazione in sovrappeso o obesa	42
1.7.2 Il <i>TNFα</i> e l'obesità	46
1.7.3 Associazione tra <i>TNFα</i> , obesità e sesso	48
1.8 LA PROTEINA C-REATTIVA: <i>MARKER</i> DI INFIAMMAZIONE ACUTA E CRONICA	51
1.8.1 PCR: <i>marker</i> di rischio di malattie cronico-degenerative e obesità	53
1.8.2 Proteina C-reattiva e Fattore di necrosi tumorale- α	55
1.8.3 Influenze dello stile di vita e del genotipo sui livelli di PCR	56
1.9 GLI ACIDI GRASSI: DEFINIZIONE ED ASPETTI BIOCHIMICI	58
1.9.1 Effetti biologici	59
1.9.2 I PUFA n-3 e le Dislipidemie	68
1.9.3 La carenza di acidi grassi n-3 nella dieta e nella gravidanza	69
1.9.4 Grassi alimentari: i buoni, i cattivi e gli essenziali	70
1.9.5 Il <i>TNFα</i> e gli acidi grassi nella dieta	72

1.10 LA SORVEGLIANZA NUTRIZIONALE	74
1.10.1 L'USDA <i>National Nutrient Database for Standard Reference</i> (SR)	77
2. OBIETTIVI DELLA RICERCA	78
3. MATERIALI E METODI	82
3.1 Disegno dello studio	82
3.2 Reclutamento delle pazienti	83
3.3 Strumenti di Sorveglianza Nutrizionale	84
3.4 Rilevazione dei dati: anagrafici, antropometrici, socio-economici e riguardanti la dieta	84
3.4.1 Valutazione dello stato nutrizionale: Indice di Massa Corporea	86
3.5 Il <i>Food Frequency Questionnaire</i>	86
3.5.1 Valutazione dell' assunzione di acidi grassi	87
3.6 Estrazione del DNA da campioni di sangue	88
3.7 Misura della concentrazione e della purezza del DNA allo spettrofotometro	89
3.8 Determinazione dei polimorfismi genetici	90
3.9 Analisi dell'equilibrio di <i>Hardy-Weinberg</i>	91
3.10 Analisi statistica dei dati	92
4. RISULTATI	94
ANALISI DESCRITTIVA SU TUTTA LA POPOLAZIONE RECLUTATA NEGLI ANNI 2009-2011	94
4.1 Popolazione in studio	94
4.1.1 Abitudine al fumo di sigaretta	95
4.2 Valutazione dello stato nutrizionale: Indice di Massa Corporea	95
4.2.1 Associazione tra stato nutrizionale ed età	95
4.2.2 Associazione tra stato nutrizionale ed etnia	96
4.2.3 Associazione tra stato nutrizionale e condizione socio-economica	97
4.3 Distribuzione dei genotipi del polimorfismo <i>TNF-α</i> -308 G>A	97
4.3.1 Interazione gene-ambiente: polimorfismo -308 G>A del gene <i>TNF-α</i> ed età	98
4.3.2 Polimorfismo -308 G>A del gene <i>TNF-α</i> e stato nutrizionale	98
4.3.3: Polimorfismo -308 G>A del gene <i>TNF-α</i> ed etnia	99
I FASE DELLO STUDIO	100
4.4 Descrizione del profilo lipidico	100
4.5 Analisi del profilo lipidico, stato nutrizionale e genotipi: interazione gene-stato nutrizionale e profili di rischio cardiovascolare	101

4.6 Concentrazione della proteina C-reattiva nella popolazione (204 donne)	105
4.6.1 Associazione tra proteina C-reattiva ed età	105
4.6.2 Analisi dei livelli di proteina C- reattiva e genotipi	106
4.6.3 Analisi dei livelli di proteina C-reattiva e stato nutrizionale	107
II FASE DELLO STUDIO	109
4.7 Descrittiva della popolazione	109
4.7.1 Analisi dell' <i>intake</i> di acidi grassi nelle 214 donne	109
5. DISCUSSIONE	113
6. CONCLUSIONI E PROGETTI FUTURI	122
7. BIBLIOGRAFIA	127
8. APPENDICE	144
8.1 ALLEGATI	144
Allegato A	144
Allegato B	147
8.2 FIGURE	151
8.3 TABELLE	155

1. INTRODUZIONE

1.1 EPIDEMIOLOGIA GENETICA

L'epidemiologia studia lo stato di salute o di malattia delle popolazioni umane in relazione ai fattori che ne determinano l'insorgenza e ne modificano la frequenza. La misura della relazione fra determinanti di salute e rischio di malattia in una popolazione ne è il principale obiettivo. La realtà biologica è per sua natura complessa e la salute dell'uomo rappresenta un modello di tale complessità. Mentre nel passato la valutazione dello stato di salute aveva come unico *target* possibile lo stato patologico conclamato, i recenti sviluppi scientifico-tecnologici e le diverse caratteristiche dei rischi hanno permesso di individuare alcuni marcatori biologici utili per registrare le variazioni precliniche dello stato di salute (Agodi et al, 2010)

Più in generale, si potrebbe affermare che l'epidemiologia offre gli strumenti per conoscere lo stato di salute di una popolazione ed indagarne i determinanti (Lopalco e Tozzi, 2003).

L'epidemiologia genetica ha un significato differente (Nell e Schull, 1954; Hopper JL; 1992). Si fa riferimento ad essa come ad una disciplina strettamente collegata all'epidemiologia tradizionale che focalizza il suo campo d'interesse sui determinanti "familiari", ed in particolare su quelli genetici, di malattia e sugli effetti congiunti dei determinanti genetici e non genetici. Essenzialmente, con l'epidemiologia genetica viene fornito un appropriato ruolo ai meccanismi biologici che sono alla base dell'azione dei geni e ai meccanismi di ereditarietà conosciuti. La parola "appropriato" è essenziale in quanto il modo in cui la biologia viene presa in considerazione varia da contesto a contesto e dipende dalle informazioni genetiche disponibili. Con l'aumentare delle tecnologie e delle conoscenze biologiche, il lavoro

dei ricercatori che studiano le conseguenze sulla salute delle varianti genetiche continua ad evolversi.

Prima che fossero disponibili le conoscenze sul DNA, gli scienziati cercavano di correlare la variazione genetica alla malattia basandosi solo sulle leggi mendeliane dell'ereditarietà (Mendel JG, 1966; Wijsman EM, 2002). Col passare del tempo, sono aumentate sempre più le conoscenze sul genoma umano e specialmente sui marcatori genetici o molecolari, sebbene questi non siano considerati necessariamente responsabili della determinazione dello stato di salute o di malattia. Con il termine di marcatore genetico viene inteso una sequenza di DNA che presenta una componente invariabile che è sufficientemente specifica per localizzarla in un singolo *locus* genomico e una componente variabile che è sufficientemente eterogenea per identificare le differenze tra gli individui e tra i cromosomi omologhi in un individuo.

1.1.1 L'epidemiologia molecolare

I progressi nel campo della biologia molecolare, della genetica, della chimica analitica e in altre scienze di base, hanno reso possibile misurare sia i contaminanti e i cancerogeni ambientali a un livello di elevata definizione. Tali strumenti e metodi, innovativi e diversificati, possono essere utilizzati per valutare la suscettibilità genetica attraverso la tipizzazione genotipica e altri metodi genetici e per identificare, a livello cellulare e molecolare, i meccanismi biologici che, a partire dall'esposizione, portano allo sviluppo e alla comparsa delle malattie. Con il termine di epidemiologia molecolare viene indicato l'approccio di studio che integra le metodologie molecolari, cellulari e tecniche *high-throughput* alla metodologia epidemiologica classica. Il termine è stato inizialmente utilizzato per lo studio

dell'epidemiologia delle infezioni e delle malattie infettive e, successivamente, all'inizio degli anni '80, è stato esteso alle applicazioni della ricerca sulle malattie cronico-degenerative. In particolare, la maggior parte delle applicazioni dell'epidemiologia molecolare alle malattie croniche riguarda oggi la ricerca sul cancro e specificamente gli studi di epidemiologia ambientale e di epidemiologia dei tumori che pongono l'accento rispettivamente sulle esposizioni e sulle malattie ridefinite a livello molecolare. Nella definizione dell'epidemiologia molecolare è utile la contrapposizione con l'epidemiologia "tradizionale". Pertanto, l'epidemiologia "tradizionale" riguarda lo studio della correlazione tra esposizione e cancro, mentre i fattori e i processi che si interpongono tra la causa – l'esposizione – e l'*outcome* – il cancro – vengono collocati nella cosiddetta "scatola nera" o *black box*. Molti studi epidemiologici "tradizionali", che vengono condotti utilizzando fonti di dati e informazioni rilevati mediante questionari o interviste, possono essere ampliati, adottando l'approccio integrato proprio dell'epidemiologia molecolare, con dati molecolari rilevati su campioni biologici appropriati che integrano il database esistente. Pertanto, negli studi di epidemiologia molecolare, la valutazione delle basi biologiche che confermano l'associazione tra causa ed effetto è più complessa, in quanto deve tenere conto delle misure biologico-molecolari per valutare l'esposizione, la dose interna, la dose biologica effettiva, gli effetti biologici precoci, la presenza di strutture e funzioni alterate, la diagnosi di cancro invasivo, la presenza di metastasi tumorali e la prognosi di malattia. In questo modo, d'altra parte, l'epidemiologo può contribuire ad aprire la "scatola nera" consentendo di comprendere e di valutare il ruolo degli eventi intermedi che definiscono la progressione dall'esposizione ai fattori esogeni sino alla manifestazione clinica della malattia, tenendo conto della complessità del sistema. L'epidemiologia molecolare

utilizza i marcatori molecolari come *end-point* intermedi per risolvere la complessità dei quesiti epidemiologici. Il valore aggiunto di questo approccio, rispetto agli studi classici di epidemiologia, è che i risultati degli studi di epidemiologia molecolare possono fornire ipotesi dirette sul meccanismo dello sviluppo della malattia e possono essere spesso tradotti in scelte terapeutiche e di Sanità pubblica. Questo è chiaramente applicabile allo studio del cancro, che rappresenta la seconda più comune causa di mortalità in tutto il mondo dopo le malattie cardiovascolari. Il monitoraggio dei biomarcatori, piuttosto che quello delle malattie, nelle popolazioni umane è il tema dell'epidemiologia molecolare, la scienza che studia i fattori di rischio e protettivi intrinseci ed estrinseci – identificati a livello molecolare – i loro meccanismi eziopatogenetici e il loro ruolo nella distribuzione e controllo delle malattie nelle popolazioni e in gruppi familiari selezionati. In tal modo l'Igiene si evolve nella nuova Sanità pubblica quale disciplina del trasferimento delle acquisizioni della ricerca scientifica (*translation research*) negli interventi di promozione della salute e di prevenzione oltre che nelle *policies* ambientali e sanitarie. Possiamo schematicamente descrivere gli obiettivi dell'epidemiologia molecolare come segue: definire accuratamente l'esposizione; predire l'*outcome* di malattia; identificare e misurare i fattori di suscettibilità genetici o acquisiti che aumentano il rischio di malattia; chiarire le interazioni cancerogeno-*target* ed i meccanismi patogenetici. Il primo obiettivo è quello di fornire le stime biologiche dell'esposizione, negli studi epidemiologici sulle cause del cancro nelle popolazioni umane. Il fine è quello di aumentare l'accuratezza delle misure di esposizione ambientale, di quelle di dose interna o di dose *target*, riducendo in tal modo l'errata classificazione effettuata negli studi epidemiologici tradizionali sugli *outcome* di malattia. Il secondo obiettivo degli studi di epidemiologia molecolare è quello di

identificare e quantificare gli eventi biologici attraverso i quali si determina la malattia, caratterizzando *in vivo* i cambiamenti genetici e cellulari reversibili e/o irreversibili che portano al cancro. Lo scopo è di misurare indicatori “surrogato” di malattia che consentano di predire, almeno in senso probabilistico, gli *outcome* in individui o popolazioni, riducendo pertanto l'intervallo di tempo che intercorre dal momento dell'esposizione all'identificazione di un effetto rilevabile. Il terzo obiettivo è quello di misurare i fattori di suscettibilità genetici o acquisiti al fine di identificare individui o gruppi con un rischio più elevato di malattia. Infine, uno studio di epidemiologia molecolare può essere utile a chiarire i meccanismi coinvolti nella patogenesi del cancro, identificando sia i marcatori di effetto che i gruppi *target* più appropriati per la valutazione del rischio nonché per la progettazione degli interventi preventivi (Agodi et al., 2010).

1.1.2 Epidemiologia del Genoma Umano

Il progresso dello *Human Genome Project* ha portato all'esplosione dell'informazione genetica. Pressoché ogni giorno vengono annunciate nuove scoperte che riguardano varianti geniche che modificano il rischio di patologie di maggiore rilievo in Sanità Pubblica, e che vanno dalle malattie croniche dell'adulto, come il cancro o il diabete, a disordini infettivi o immunologici, a malattie che colpiscono le fasce d'età neonatale ed infantile. La genetica del presente e del futuro riguarda tutte le malattie, e non soltanto le cosiddette “malattie genetiche”. Il ritmo continuo e intenso con cui si susseguono le scoperte genetiche ha determinato la messa a punto di una molteplicità di test genetici per molte malattie, lasciando tuttavia aperta la questione sulla loro validità rispetto a quanto i test genetici siano in grado di predire la probabilità che una persona sana possa sviluppare la malattia. Per

tradurre i risultati della ricerca genetica in opportunità di trattamento e di prevenzione delle malattie, nonché di promozione della salute, sono necessari studi epidemiologici di popolazione per quantificare l'impatto delle varianti geniche sul rischio di malattia, sul rischio di mortalità o di invalidità, e dei fattori di rischio modificabili che interagiscono con le varianti geniche. Gli studi epidemiologici sono oggi indispensabili per la validazione di nuovi test genetici, per misurare i valori predittivi di malattia, sia positivi che negativi, per monitorarne l'uso ed infine per determinarne la sicurezza e l'efficacia nelle diverse popolazioni (Khoury MJ, 1997). L'acronimo "HuGe", che in inglese significa "enorme", ben si addice alla quantità di dati di popolazione già disponibile e quella che prevediamo sarà prodotta nei prossimi anni, con il procedere dell'*Human Genome Project*. Il termine *Human Genome Epidemiology* (HuGE) indica un campo di indagine in evoluzione che adopera l'approccio sistematico della metodologia epidemiologica per studiare l'impatto delle variazioni geniche sulla salute e sulla malattia.

Come brillantemente esposto da Muin J. Khoury e Janice S. Dorman in un editoriale pubblicato ormai un decennio fa sull'*American Journal of Epidemiology*, l'epidemiologia del genoma umano, HuGE, viene oggi vista come l'intersezione tra due discipline emergenti: l'epidemiologia genetica, disciplina caratterizzata dall'importanza conferita agli aspetti statistico-epidemiologici della ricerca sui determinanti genetici delle malattie e sulla valutazione del rischio genetico, e l'epidemiologia molecolare, la scienza che utilizza la biologia molecolare per definire l'eziologia, la distribuzione e il controllo delle malattie nelle popolazioni e nei gruppi a rischio. Nonostante alcuni ricercatori ritengano che i due termini siano sinonimi della stessa disciplina, mentre altri percepiscono delle importanti differenze nella loro evoluzione, nei loro obiettivi e nei loro punti focali, su una conclusione

sono tutti d'accordo: il ruolo critico e centrale degli studi di popolazione nel tradurre i risultati dell'*Human Genome Project* in applicazioni in medicina e Sanità pubblica.

L'epidemiologia del Genoma Umano è la disciplina dedicata a valutare:

- la prevalenza delle varianti geniche nelle diverse popolazioni;
- le dimensioni del rischio associato a specifiche varianti geniche nelle diverse popolazioni (rischio relativo ed assoluto);
- il contributo delle varianti geniche nel determinare l'incidenza delle malattie nelle diverse popolazioni (rischio attribuibile);
- le dimensioni del rischio di malattia associato all'interazione tra gene e gene e tra gene e ambiente nelle diverse popolazioni;
- la validità dei test genetici nelle diverse popolazioni;
- le dimensioni ed i determinanti dell'utilizzazione dei Servizi di Genetica e dei test genetici nelle diverse popolazioni;
- l'efficacia e l'impatto dei Servizi di Genetica e dei test genetici sulla morbosità, sulla invalidità, sulla mortalità e sui costi nelle diverse popolazioni.

L'evoluzione dell'epidemiologia delle malattie genetiche nell'era post-genomica è in relazione a due aspetti:

1. Il progresso dell'*Human Genome Project*;
2. La consapevolezza della collettività laica nei riguardi della salute.

Il crescente interesse nelle potenzialità dello *screening* genetico per l'identificazione degli individui a rischio e per la prevenzione delle malattie si accompagna alla diffusa percezione da parte dell'opinione pubblica nonché di alcuni ricercatori, che l'introduzione di tali test sia la soluzione di tutti i problemi che riguardano la salute, dalle malattie cardiovascolari al cancro: una grossolana semplificazione (Agodi et al., 2010).

1.1.3 Marcatori molecolari in epidemiologia

Nel 1987 il *National Research Council* (NRC) pubblicò uno schema sull'uso delle risposte biologiche per lo studio del cancro associato all'esposizione ambientale.

Lo schema descrive i passaggi sequenziali che, a partire dalla fase iniziale denominata "esposizione", portano alla malattia conclamata. Questo schema è diventato un riferimento importante per ogni riflessione sull'uso delle risposte biologiche per lo studio del cancro associato all'ambiente. Queste risposte, o biomarcatori consistono in alterazioni cellulari, biochimiche e molecolari misurabili nei tessuti, nelle cellule e/o nei fluidi biologici, e vengono convenzionalmente classificate in marcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità. I biomarcatori possono essere misurati quantitativamente o qualitativamente mediante metodi biochimici, immunochimici, citogenetici, molecolari e genetici; possono essere determinati in diversi materiali biologici, quali tessuti normali o tumorali, sangue e urine e possono essere costituiti da DNA, RNA, proteine e altro. Secondo una classificazione che tiene conto del loro significato all'interno dello schema, i marcatori biologici vengono suddivisi in: marcatori di esposizione, a loro volta classificati in marcatori di dose interna e marcatori di dose biologica effettiva; marcatori di effetto, quali i marcatori di risposta biologica precoce e i marcatori di alterazione di strutture e funzioni; marcatori di suscettibilità.

✓ Marcatori di esposizione

L'esposizione viene definita come la presenza di una certa sostanza o insieme di sostanze chimiche nell'ambiente in cui vivono gli individui "a rischio" e che porta all'introduzione della sostanza stessa nell'organismo. I marcatori di esposizione sono misure dell'esposizione costituite dai livelli di fattori esogeni presenti nei fluidi biologici degli individui esposti. In questa categoria di marcatori vengono incluse le

sostanze chimiche (tra le quali le diossine, i bifenili policlorinati, le amine aromatiche, gli idrocarburi policiclici aromatici, le aflatossine e i metalli pesanti), i prodotti del loro metabolismo, i nutrienti (vitamine e microelementi) e gli agenti infettivi (virus, *Helicobacter pylori*). Uno dei limiti più frequenti degli studi di epidemiologia ambientale è costituito dall'incertezza qualitativa e/o quantitativa sull'esposizione agli agenti cancerogeni. Le esposizioni ambientali e occupazionali sono comunque fenomeni complessi e per di più si verificano solitamente decenni prima che la specifica patologia ad esse associata si manifesti. In tali casi, le informazioni sull'esposizione vengono ricostruite per mezzo di "dati surrogato". Non sorprende, pertanto, che spesso si verifichino errori di classificazione degli esposti e dei non-esposti, dei più esposti e dei meno esposti. I marcatori di dose interna sono un gruppo di marcatori di esposizione che evidenziano l'avvenuto assorbimento della sostanza esogena all'interno dell'organismo umano. In generale, i composti e gli elementi chimici, una volta assorbiti, possono mantenere la propria struttura o essere modificati per via metabolica e, infine, possono essere eliminati o accumulati nel tessuto adiposo e/o nel tessuto osseo. Le aflatossine sono delle micotossine che possono essere presenti in alcuni alimenti contaminati quali arachidi, noci e diversi altri tipi di frutti, frumento e soia. L'esposizione alle aflatossine, insieme all'infezione da virus dell'epatite B o C e al consumo di alcol costituiscono i principali fattori di rischio per l'epatocarcinoma, la terza causa di morte per tumore in tutto il mondo. I marcatori di dose biologica effettiva evidenziano l'avvenuta interazione tra il composto assorbito e una struttura subcellulare. Gli addotti alle proteine, al DNA e all'RNA rappresentano i più utilizzati marcatori di dose biologica effettiva.

✓ **I marcatori di effetto**

sono utilizzati per predire e valutare in termini probabilistici il rischio di *outcome* e cioè di malattia. Il suo valore predittivo ha un significato probabilistico e questa considerazione non è limitata solo ai tumori, ma piuttosto è generalizzabile anche ad altre patologie. Un esempio di marcatori di effetto è costituito dalle alterazioni genetiche, che possono essere indotte da alcuni agenti cancerogeni o da alcuni loro prodotti intermedi.

✓ **Marcatori di suscettibilità**

sono indicatori di fattori genetici preesistenti all'esposizione e da questa indipendenti, ma che possono influenzare la probabilità che la malattia sia il risultato dell'esposizione. Essi possono essere ereditati o geneticamente determinati o acquisiti e sono indipendenti dall'esposizione ambientale. Pertanto, la popolazione esposta risulta suddivisa in due gruppi distinti, l'uno a più elevato rischio genetico e l'altro a minor rischio genetico di sviluppare la malattia a seguito degli stessi livelli di esposizione ambientale. Il genoma umano contiene circa tre miliardi e mezzo di paia di basi e di queste dieci milioni sono probabilmente differenti tra individui diversi, costituendo i cosiddetti polimorfismi genetici. I polimorfismi sono variazioni nella sequenza del DNA che includono delezioni, inserzioni, sostituzioni o mutazioni diverse e generalmente sono presenti nella popolazione con una frequenza di almeno l'1%. Le varianti genetiche, sia allo stato omozigote che eterozigote, nei geni di suscettibilità possono conferire differenti caratteristiche fenotipiche rispetto al *wild type*. La variazione di una singola base è definita *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) e sono potenzialmente responsabili della suscettibilità a diverse malattie. I marcatori di suscettibilità sono degli indicatori misurabili della presenza di fattori genetici o acquisiti, esistenti prima e indipendentemente dall'esposizione, che

influenzano la probabilità che la malattia si verifichi a seguito dell'esposizione esogena. La suscettibilità è definita come un “modificatore d'effetto” che può esprimersi durante ogni fase tra l'esposizione e l'espressione clinica della malattia.

Solo una piccola percentuale dei diversi tipi di cancro ha un'origine genetica “franca”, nel senso che è associata a geni ad alta penetranza (definita come la probabilità con la quale un genotipo esprime il fenotipo). All'altro estremo della scala, accanto a modelli di tumori per cui è riconosciuta una componente genetica più o meno importante, esistono esempi di malattie che sono interamente dovute a cause ambientali senza alcun ruolo riconosciuto della predisposizione genetica. La maggior parte dei tipi di cancro, comunque, sono probabilmente collocati in posizione intermedia in questa scala – ad esempio sono dovuti a un'interazione tra esposizione ambientale e suscettibilità genetica dovuta a geni a bassa penetranza ma ad elevata frequenza. I geni di suscettibilità possono modulare tutte le fasi del processo di carcinogenesi. Possono essere molto diffusi nella popolazione, ma scarsamente correlati con il rischio di insorgenza della malattia o, al contrario, essere relativamente rari ma altamente correlati con il rischio di insorgenza della malattia (Fig. 1) (Agodi et al, 2010).

Un tipo di suscettibilità è correlata al metabolismo dei carcinogeni. Soggetti con SNP in un particolare *locus* genico possiedono un *deficit* negli enzimi coinvolti nel metabolismo dei carcinogeni, e quindi sviluppano il cancro più facilmente se esposti alla sostanza. In aggiunta ai polimorfismi nel metabolismo dei carcinogeni, una potenziale fonte di variabilità è costituita dalla capacità di riparazione del DNA, incluse le sindromi da instabilità genetica (Vineis e Kriebel, 2006).

Le abitudini alimentari sono state riconosciute come essere importanti fattori ambientali modificabili che influenzano il rischio di cancro ed i vari stadi del

processo neoplastico. Nonostante alcuni ricercatori hanno stimato che circa il 30-40% di tutti i casi di cancro sono correlati alle abitudini alimentari, la percentuale attuale è altamente dipendente da specifici tipi di alimenti consumati e da specifici tipi di cancro (*World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997*).

Benché ottimizzare il consumo di specifici alimenti e dei loro componenti bioattivi sembra una strategia non invasiva e costo efficace, per ridurre il peso del cancro non è sicuramente un processo semplice. Questo probabilmente a causa delle scarse informazioni relative all'effetto di milioni di alimenti, dei diversi componenti alimentari e delle loro interazioni (Milner JA, 2004).

Sfortunatamente, gli studi di intervento a lungo termine, che sarebbero necessari per definire adeguatamente il bisogno di componenti alimentari bioattivi, sono improponibili in termini di tempo e di costi. Sono quindi necessarie delle procedure alternative che usano marcatori biologici sensibili che possono essere utili come predittivi per la minima quantità di alimento e/o di componente necessario per ottenere la risposta desiderata nei soggetti considerati a rischio.

1.1.4 I polimorfismi genetici e i metodi per evidenziarli

La letteratura internazionale recente riporta l'identificazione di numerosi SNP che possono predire la suscettibilità al cancro e ad altre patologie cronico-degenerative. Esistono numerose tecniche che consentono l'identificazione dei polimorfismi genetici in campioni di DNA di varia origine (sangue, urine, tessuti e altri campioni). Tali metodi includono il sequenziamento del DNA, considerato il *gold standard* per la genotipizzazione degli SNP ma che presenta costi elevati che spesso non consentono il suo utilizzo in studi epidemiologici che includono numerosi

individui. Il sequenziamento del DNA è considerato il *gold standard* per la genotipizzazione degli SNP. Utili alternative sono rappresentate dai metodi di identificazione degli SNP basati sulla *polymerase chain reaction* (PCR). Per la visualizzazione dei risultati dell'amplificazione viene comunemente utilizzata l'elettroforesi su gel che separa il DNA in base alle dimensioni, applicando un campo elettrico continuo. Per l'identificazione di SNP sono stati messi a punto diversi metodi basati sulla PCR. La cosiddetta *amplificazione allele specifica* utilizza *primer* complementari alla sequenza normale (senza il polimorfismo) e a quella mutata (contenente lo SNP).

Un'ulteriore tecnica basata sulla PCR, la *Multiplex PCR*, prevede l'utilizzo, nella stessa reazione di PCR, di *primer* complementari a più sequenze da amplificare, anche di più geni contemporaneamente. Alcuni polimorfismi comportano l'alterazione, la comparsa o la perdita di siti di restrizione in alleli specifici. Pertanto, questi polimorfismi possono essere identificati mediante PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) e si basa sulla digestione sito-specifica del DNA amplificato tramite PCR, con enzimi di restrizione seguita dall'analisi elettroforetica su gel. Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi di origine batterica in grado di riconoscere specifiche sequenze di 4-8 nucleotidi e di tagliare in quelle posizioni il DNA. Alcuni SNP che modificano un sito di restrizione possono essere riconosciuti direttamente mediante elettroforesi dopo digestione con l'enzima di restrizione appropriato. Il principale limite della metodica PCR-RFLP è costituito dal fatto che i polimorfismi devono essere localizzati entro siti di restrizione specifici.

Recentemente sono stati messi a punto dei metodi di identificazione di SNP basati sul principio della *Real-time* PCR. In particolare, l'analisi denominata *allele*

discrimination/ SNP real-time utilizza sonde marcate con fluorescenza per determinare la composizione allelica dei campioni di DNA da analizzare.

Dopo l'amplificazione, i risultati vengono analizzati e letti tramite l'utilizzo di *software* specifici, in grado di misurare la fluorescenza ottenuta durante l'amplificazione. I principali vantaggi di questo metodo, rispetto alle tecniche convenzionali basate su PCR, consistono nel fatto che contemporaneamente si possono analizzare, in poco tempo circa 1000 campioni ciascuno contenente quantità inferiori di DNA e tempi più brevi rispetto alla PCR classica. Un valore aggiunto è costituito da una più elevata specificità conferita dalle sonde marcate a fluorescenza e dalla semplificazione della tecnica di rilevazione che non comporta l'utilizzo di elettroforesi su gel (Agodi et al, 2010).

1.2 LA GENETICA DI POPOLAZIONE

La genetica di popolazione è quel campo della genetica che studia l'ereditarietà, in gruppi di individui, di caratteri che siano determinati da uno o da pochi geni. I genetisti di popolazioni studiano i modelli di variabilità genetica che si trovano all'interno di popolazioni e come questi modelli variano, in altre parole come si evolvano, nel tempo e nello spazio. In questo campo la prospettiva si sposta dal singolo individuo per concentrarsi, invece, su di una popolazione mendeliana, intesa come un gruppo di individui interfertili che condividono un insieme di geni comune (*pool* genico).

I genetisti sovente sviluppano delle equazioni e dei modelli matematici per descrivere cosa accade, in varie condizioni, al *pool* genico di una popolazione.

Un esempio è dato dall'insieme di equazioni che descrivono l'influenza dell'accoppiamento casuale nelle frequenze alleliche e genotipiche di una popolazione infinitamente grande, che nel complesso formano un modello chiamato legge di *Hardy-Weinberg*. La legge di *Hardy-Weinberg* è il principio più importante della genetica di popolazioni, poiché fornisce una semplice spiegazione di come i principi mendeliani, basati sulla meiosi e sulla riproduzione sessuale, siano alla base anche dei concetti di frequenze alleliche e genotipiche di una popolazione.

La legge di *Hardy-Weinberg* descrive cosa accade alle frequenze alleliche e genotipiche di una grande popolazione quando i gameti si incontrano in maniera casuale e non sono presenti mutazioni, migrazione e selezione naturale.

Se queste condizioni sono soddisfatte, le frequenze alleliche non variano di generazione in generazione, e le frequenze genotipiche si stabilizzano dopo una generazione secondo le proporzioni p^2 (AA), $2pq$ (Aa) e q^2 (aa), dove p e q sono le frequenze alleliche nella popolazione. Per stabilire se i genotipi di una popolazione

siano in accordo con le proporzioni di Hardy-Weinberg, per prima cosa si calcolano p e q dalle frequenze genotipiche osservate.

Una volta ottenute le frequenze alleliche, si possono ottenere le frequenze genotipiche attese e si confrontano con quelle effettivamente osservate mediante il test del chi-quadrato. Il test del chi-quadrato fornisce la probabilità che la differenza tra quanto osservato e quanto atteso, secondo la legge di *Hardy-Weinberg*, sia dovuta al caso.

1.3 NUTRIGENOMICA E NUTRIGENETICA

Il genoma umano contiene oltre 30.000 geni ed è responsabile della produzione di più di 100.000 proteine funzionalmente differenti (Trujillo et al., 2006).

Il successo del Progetto Genoma Umano e la potenza degli strumenti della biologia molecolare ci hanno fatto entrare in una nuova era della medicina e della nutrizione. Questa nuova area di ricerca studia l'integrazione nutriente-gene che può svilupparsi in direzioni dicotomiche. Una può concentrarsi sugli effetti dei nutrienti e dei cibi bioattivi nella regolazione dell'espressione genica (la nutrigenomica) e l'altra sull'impatto delle variazioni della struttura genica in risposta a nutrienti o cibi bioattivi (nutrigenetica). La sfida dei nutrizionisti della Sanità Pubblica sarà di equilibrare i bisogni della comunità con quelli dell'individuo (Gillies PJ, 2003).

La nutrigenomica è definita come lo studio dell'interazione tra i geni e i componenti bioattivi degli alimenti. Questa nuova disciplina fornisce una base per comprendere come tra gli individui variano gli effetti sulla salute dovuti ai comportamenti alimentari. Il concetto di nutrigenomica è costruito sulle seguenti premesse: i) la dieta e i suoi componenti possono alterare il rischio di sviluppo di una malattia attraverso processi di modulazione multipla che coinvolgono l'incidenza, l'inizio, la progressione e/o la gravità della malattia; ii) i componenti degli alimenti possono agire sul genoma umano, sia direttamente che indirettamente, alterando l'espressione dei geni e i prodotti genici; iii) la dieta potrebbe compensare o accentuare gli effetti dei polimorfismi genetici e iv) le conseguenze della dieta dipendono dal bilancio tra lo stato di salute e di malattia e, dal *background* genetico dell'individuo (Ames BN, 2003; Kaput e Rodriguez, 2004).

La nutrigenetica, invece, fa riferimento all'analisi retrospettiva delle variazioni genetiche tra gli individui con riferimento alle risposte cliniche provocate da nutrienti

specifici. Essa offre le premesse di una nutrizione personalizzata, le caratteristiche genetiche del consumatore basate sulle conoscenze delle varianti genetiche e delle variazioni dei recettori dei nutrienti (Gillies PJ, 2003).

Le conoscenze su come la dieta induce la risposta fenotipica dipendente dal *background* genetico dell'individuo (nutrigenetica), dall'espressione dei geni (epigenomica e trascrittomica), dai cambiamenti nella quantità e nell'attività delle proteine (proteomica), e il cambiamento nel piccolo peso molecolare dei composti (metabolomica): collettivamente sono definite "*omics*".

Lo studio della nutrigenomica e/o dei cambiamenti nella proteomica e metabolomica a essa associati, può identificare i *target* molecolari per una prevenzione basata sulla nutrizione. Questa è un'informazione chiave per un approccio personalizzato alla nutrizione, che in definitiva potrebbe distinguere i *responder* dai *non-responder*.

Indubbiamente, per comprendere l'interazione tra i componenti degli alimenti e i prodotti genici esiste la necessità di ulteriori ricerche nell'*omics* della nutrizione. Chiarire, però, la moltitudine di *pattern* di nutrigenomica, proteomica e metabolomica che emergono dall'assunzione di alimenti non è semplice ma probabilmente questo approccio fornisce informazioni dettagliate sull'associazione dieta-salute (Trujillo et al., 2006).

Numerosi componenti alimentari possono alterare gli eventi genetici e epigenetici e di conseguenza influenzare lo stato di salute. Oltre ai nutrienti essenziali quali il calcio, lo zinco, il selenio, i folati, e le vitamine C ed E, esistono una varietà di nutrienti non essenziali e componenti bioattivi che sembrano influenzare significativamente lo stato di salute. Questi componenti alimentari bioattivi essenziali e non essenziali modificano un certo numero di processi cellulari associati con la salute e la prevenzione delle malattie, dei processi di carcinogenesi, di bilancio

ormonale, di segnali cellulari, di controllo del ciclo cellulare, di apoptosi e angiogenesi. Spesso i componenti alimentari bioattivi modificano molti processi simultaneamente. Una delle reali sfide, quindi, è l'identificazione dei processi che sia singolarmente che in combinazione sono molto importanti per portare dei cambiamenti fenotipici.

La rivoluzione genetica e delle “*omics*” permetteranno di capire un certo numero di argomenti in tema di salute, incluso il ruolo della nutrizione nella prevenzione delle malattie cronic-degenerative (Trujillo et al., 2006).

1.3.1 Interazione gene-ambiente nelle malattie dell'uomo

Le malattie dell'uomo, come del resto tutte le sue caratteristiche fisiologiche, dipendono da cause genetiche e/o da cause ambientali (“*nature and nurture*”), che agiscono non in opposizione ma in cooperazione. Le malattie genetiche sono quelle dovute ad anomalie quantitative o qualitative del patrimonio genico dell'individuo, cioè del suo “genoma”. Analogamente, le malattie da causa ambientale sono quelle dovute all'azione di uno o più fattori ambientali.

Accanto a queste due categorie esiste però un ampio gruppo di altre malattie che si attribuiscono al concorso causale di uno o più fattori ambientali, e per tale motivo esse vengono definite malattie multifattoriali.

Oltre che concorrere con le anomalie del genoma nel causare le malattie multifattoriali, i fattori ambientali cosiddetti “mutageni” sono anche responsabili di mutazioni del genoma stesso, e quindi, sono alla base delle malattie genetiche, svolgendo un ruolo essenziale nel mantenimento della loro frequenza.

Sin dai tempi di Archibald Garrod (Garrod A, 1902) è stato accettato che l'eziologia delle malattie più comuni include non solo cause genetiche e ambientali, ma anche

l'interazione fra le due componenti. Garrod ha suggerito che “le influenze della dieta e delle malattie” possono mascherare alcuni degli “errori congeniti del metabolismo” ed ha proposto che “l'idiosincrasia in riferimento ai farmaci” è presumibilmente dovuta a differenze ereditarie presagendo il campo della farmacogenetica mezzo secolo prima. Un aspetto particolare, ma molto pertinente, della interazione tra geni ed ambiente nella eziopatogenesi delle malattie è dato dalla farmaco genetica che è quella parte della genetica che studia le variazioni della risposta individuale alla somministrazione di farmaci condizionate dalla costituzione genica dell'individuo. Uno stesso farmaco a parità di dosi può evocare in individui diversi risposte differenti non solo quantitativamente (nel senso cioè di comparsa solo in alcuni soggetti e non in altri di reazioni inusuali); ne consegue che un farmaco sicuro ed efficace in un soggetto, può essere inefficace o anche dannoso in un altro soggetto. Col termine farmacogenomica si indica la disciplina che studia la scelta razionale e individualizzata dei farmaci basata sul genotipo dei singoli soggetti.

Nel contesto della genetica medica e dell'epidemiologia lo studio dell'interazione gene-ambiente è utile per varie ragioni. Valutando separatamente i contributi dei geni e dell'ambiente, e trascurando la loro interazione, si stimerà in modo scorretto la proporzione della malattia (rischio attribuibile di popolazione) che invece è spiegata in maniera più accurata dai geni, dall'ambiente e dai loro reciproci effetti.

L'analisi dei fattori ambientali negli studi epidemiologici su individui che sono geneticamente suscettibili all'esposizione, dovrebbe incrementare l'importanza del rischio relativo, aumentando la certezza che le associazioni non sono dovute a cambiamenti.

L'identificazione della suscettibilità e/o degli alleli resistenti in studi su geni candidati fornisce una diretta evidenza che questi geni e le loro vie biologiche sono

rilevanti in specifiche malattie umane. Conoscendo tali vie si potrebbe determinare quali composti in un *mix* complesso causano la malattia. Infine, la conoscenza sulle interazioni gene-ambiente potrebbe dare consigli preventivi individuali prima della diagnosi della malattia, in più si possono offrire trattamenti personalizzati dopo che la malattia o la suscettibilità ad una malattia è stata diagnosticata.

Alcune interazioni gene-ambiente possono essere identificate senza alcuna analisi molecolare; un esempio è rappresentato dal forte effetto dell'esposizione alla luce solare sul rischio di cancro in individui di pelle chiara rispetto agli individui con pelle scura. Comunque, l'espansione delle conoscenze, in particolare dopo il completamento del Progetto Genoma Umano, nel definire le differenze genetiche a livello della sequenza del DNA apre nuove prospettive nella ricerca sulle interazioni gene-ambiente.

Sebbene le parole "interazione gene-ambiente" sono frequentemente usate per indicare una specifica relazione tra geni ed ambiente, la maggior parte dei modelli di malattia esistenti differiscono rispetto alla loro associazione statistica. Un'interazione gene-ambiente sarà accettata solamente se essa può essere riprodotta in due o più studi e se è biologicamente plausibile. Ottenere tali evidenze scientifiche necessiterà di un elevato grado di coordinamento tra i diversi studi, e richiederà metodologie per raggruppare i dati di vari studi non pubblicati, per evitare la pubblicazione di errori.

La rapidità delle tecnologie genotipiche, come le scansioni degli SNP dell'intero genoma, mantengono la promessa di trovare le maggiori varianti genetiche che contribuiscono al rischio di sviluppare le malattie più comuni nei prossimi 5-10 anni. Ottenere informazioni tangibili sull'ambiente e lo stile di vita unito ai modelli biologici, per stimare queste varianti genetiche, sarà dunque cruciale per la valutazione dell'interazione gene-ambiente.

Lo studio delle interazioni gene-ambiente richiede informazioni su entrambi gli elementi della relazione. La predisposizione genetica può essere dedotta dalla storia familiare, dal fenotipo (ad es. il colore della pelle) o dall'analisi diretta delle sequenze del DNA. I fattori ambientali e lo stile di vita sono determinati negli studi epidemiologici usando informazioni ottenute da interviste o questionari, da registri o misure dirette dei partecipanti o da biomarcatori di esposizione.

Fino a poco tempo fa, molti studi di predisposizione genetica (ad es. studi basati sull'albero genealogico) hanno ottenuto poche informazioni sullo stile di vita e sull'ambiente. Più recentemente, sia in studi di associazione sia in studi di ereditarietà, la raccolta di dati sia ambientali che genetici sta diventando più comune e l'uso di studi basati sulla popolazione viene maggiormente utilizzato in epidemiologia genetica (Thomas DC, 2000).

1.4 SISTEMA HLA: CARATTERISTICHE GENETICHE E FUNZIONI

Tra le attività specifiche attraverso le quali il Sistema Immunitario svolge la funzione primaria di immunosorveglianza nei confronti degli agenti patogeni o tossici, vi è la sintesi di glicoproteine finalizzate a presentare, sulle membrane cellulari, una serie di peptidi antigenici necessari all'attivazione dei linfociti chiave delle reattività immunitarie sia umorali che cellulari. Tali molecole appartengono a quel sistema convenzionalmente definito con il termine di *Complesso Maggiore di Istocompatibilità* (MHC) e che, nell'uomo, prende il nome di HLA (*Human Leucocyte Antigens*) in ragione delle prime osservazioni condotte sui leucociti. Nei soggetti sani, l'espressione delle molecole HLA avviene generalmente a seguito dell'invasione sostenuta, nell'organismo ospite, da agenti patogeni o, comunque, tossici. Essa normalmente si riduce o si annulla in conseguenza dell'inattivazione biologica o dell'espulsione dal medesimo organismo degli elementi nocivi. In presenza di fenomeni patologici ad andamento cronico-ricidivante, la produzione dei peptidi antigenici di membrana si attiva in forma anomala e prolungata non solo negli individui eventualmente sottoposti a trapianto d'organo, ma anche in quelli interessati da fenomeni di sensibilizzazione e perdita di tolleranza verso *triggers* ambientali nocivi, particolarmente quelli sintetici, oppure in presenza di agenti infettivi o comunque di altra tipologia, compresi gli alimenti. E', dunque, da considerarsi affatto casuale l'associazione, peraltro statisticamente significativa, tra le suddette anomalie di espressione e la trasmissione genetica dei comuni fattori predisponenti ai Disordini Infiammatori Immuno-Mediati (IMID). Inoltre le medesime produzioni, per quanto al centro di irrisolte controversie inerenti la loro reale funzione, costituiscono un ausilio ineguagliabile nella diagnostica delle più

comuni forme infiammatorie e, come tali, rimangono una chiave privilegiata di lettura delle più innovative ed approfondite attività di indagine e ricerca.

Il Sistema HLA reca, dunque, le informazioni geniche per la sintesi di una serie di glicoproteine di membrana cellulare. La presenza di tali glicoproteine non è costante, ma soggetta a modulazione e, quindi, ad una espressione funzionale allo stato di attivazione della cellula, con variazioni espressive a loro volta strettamente dipendenti dall'intervento di importanti mediatori tra i quali alcune interleuchine e/o interferoni (Horton et al., 2004). Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è di 36 kb localizzato sul cromosoma 6, bande p21.2-21.31, rappresenta un ampio *cluster* di geni sia per il numero che per l'importanza delle funzioni immunologiche codificate (Fig. 2). Una delle famiglie dei geni di MHC, i geni degli antigeni leucocitari umani (HLA), sono i più polimorfici scoperti fin'ora: infatti, sono stati descritti oltre cento alleli. Questi polimorfismi hanno permesso ampi studi di popolazione che rivelano un certo numero di interessanti associazioni fra il MHC e alcuni fenomeni (Grue et Weissman, 1997).

Nell'MHC sono stati mappati oltre 250 geni, raggruppati in tre classi distinte: HLA Classe I, HLA Classe II e HLA Classe III (Fig. 3). Solo il 28% dei geni (meno di 80) inclusi in questo complesso, individuabili con le sigle HLA A, B, C, DR, DQ, DP, sembrano essere significativamente coinvolti nelle dinamiche immunologiche.

I geni HLA A, B, e C, detti geni HLA di classe I, producono glicoproteine di membrana espresse praticamente in tutte le cellule nucleate dell'organismo. D'altro canto, i geni HLA DR, DQ e DP, chiamati geni HLA di classe II, producono ed esprimono le glicoproteine solo su alcune cellule specializzate come macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B. La caratteristica principale dei geni HLA di classe I e II risiede nel loro elevatissimo polimorfismo allelico (Horton et al 2004). Queste

glicoproteine interagiscono a livello intracellulare con peptidi antigenici ed emergono sulla superficie cellulare, dove sono presentati e processati dalle cellule T, regolando la risposta delle cellule T contro i peptidi antigenici. La risposta dipende dall'abilità degli antigeni HLA di legare alcuni peptidi e non altri ed è questa la base per il controllo antigene - specifico della risposta immune. In particolare: la regione della classe I presenta l'antigene per le cellule CD8, quella della classe II l'antigene per le cellule CD4. Inoltre, i geni nella regione della classe II codificano per delle componenti del proteosoma citoplasmatico che degrada le proteine a peptidi. Qui viene anche codificato il gene DM, il quale facilita l'assemblaggio delle proteine di classe II. In posizione centromerica rispetto alla regione della classe I c'è un *cluster* di geni che codificano per tre proteine correlate con l'infiammazione: il fattore di necrosi tumorale- α ($TNF\alpha$), la linfotossina α (LTA) e la linfotossina β (LTB). La regione della classe III contiene molti geni con la capacità di modulare la funzione immune, includendo il complemento e i geni *TNF*. Tuttavia non ci sono similarità tra le molecole di classe I e II e i prodotti del gene di classe III. E' notevole come la lista dei geni e dei segmenti cromosomici correlati al sistema immune, potenzialmente originati come duplicazioni di parti del MHC, sia cresciuta di recente. L' MHC è di principale interesse biomedico a causa del suo contributo al rigetto nei trapianti e alla variazione nella sequenza proteica delle molecole stesse di classe II (Dawkins et al., 1999; Gruen.et Weissman, 1997).

1.4.1 L'aplotipo ancestrale 8.1

Gli alleli HLA vengono ereditati in modo mendeliano codominante; questo è il motivo per il quale ciascun individuo può manifestare i due alleli d'origine paterna e materna. Il complesso dei geni HLA che, per via della loro associazione nello stesso

cromosoma, vengono ereditati insieme viene definito *aplotipo*. Senza influenze esterne, ogni possibile aplotipo avrebbe la medesima frequenza, tuttavia si osserva che molti alleli presentano la tendenza ad essere trasmessi assieme, secondo gruppi definiti. La natura di questo fenomeno è verosimilmente funzionale, legata ad una maggior resistenza immunitaria favorita da alcune combinazioni alleliche; inoltre, la regione HLA conserva un limitato *crossing-over* che impedisce la dispersione degli alleli nell'ambito della popolazione. L'ereditarietà delle malattie immuno-mediate non segue esclusivamente i classici e semplici modelli di trasmissione mendeliani (dominante, codominante, recessivo o *x-linked*), ma è di tipo multifattoriale: si osserva una certa "familiarità" della patologia, con un aumento dei casi tra i parenti di 1° grado del probando rispetto alla popolazione generale. Vi è, inoltre, un forte tasso di concordanza della patologia tra i gemelli monozigoti rispetto ai gemelli dizigoti (Pontieri et al. 1996).

L'aplotipo viene definito "ancestrale" poichè evidenzia il suo grado di conservazione; gli aplotipi presenti nelle popolazioni sono sequenze continue e derivate, con piccole alterazioni, da un aplotipo ancestrale, antenato di tutti gli aplotipi attuali. Questi aplotipi conservati determinano un assortimento non casuale di alleli di loci contigui, facendo riferimento al "*linkage disequilibrium*". L'aplotipo ancestrale 8.1 è stato associato in soggetti sani con un certo numero di disfunzioni del sistema immune ed è stato dimostrato che un ristretto numero di geni all'interno di esso modifica le risposte immunitarie, con alterazioni del bilancio delle citochine prodotte, determinando molteplici malattie immuno-patologiche (Candore et al., 2002).

Questo aplotipo esteso è condiviso dal 10% dei Nord Europei, si estende per 6Mb dall'HLA-A al microsatellite D6S276. Si ritiene che questo sia un aplotipo

relativamente giovane e che l'elevato linkage disequilibrium che lo caratterizza sia dovuto ad un tempo evolutivo insufficiente perché si siano verificate molte ricombinazioni. Tuttavia è anche possibile che l'AH 8.1 sia molto più antico e che sia invece dovuto ad un forte vantaggio selettivo. Un'ulteriore semplice spiegazione potrebbe essere che certi aplotipi restano uniti perché insieme lavorano meglio. Questo spiegherebbe anche perché gli aplotipi di solito si trovano a blocchi, intervallati da hot spot di ricombinazione. Infatti l'intero genoma sembra organizzato in un mosaico di blocchi aplotipici, punteggiati da hot spot ricombinazionali, come è stato dimostrato recentemente dal progetto genoma e l'AH8.1 costituisce uno di questi blocchi (Mantovani et al, 1993).

L'aplotipo 8.1 AH è unico nella sua associazione con un certo numero di malattie immunopatologiche debilitanti ed è strettamente associato nei soggetti con alterazioni nella risposta ai mitogeni e agli antigeni, infatti è risaputo che l'aplotipo *HLA* controlla la risposta immunitaria in modo antigene-specifico (Price et al., 1999; Caruso et al., 2000) e influenza il bilancio delle citochine prodotte (Lio et al. 2001). Dati recenti indicano che alleli e/o aplotipi, in particolare l'aplotipo 8.1, codificati nella regione dell'MHC di classe III del braccio corto del cromosoma 6, possono sia modulare il rischio di sviluppo del cancro al seno ed al colon-retto che essere associati a gravi disturbi del sistema immunitario con aumento di TNF α . In questa regione sono stati individuati diversi polimorfismi (RAGE 429 T>C; HSP70-2 1267 A>G; LTA 252 A>G) tra cui il polimorfismo TNF -308 G>A (Toth et al., 2007). Inoltre, si è osservato che esiste in tutte le popolazioni caucasiche un'associazione tra le malattie autoimmuni e i geni dell'aplotipo *HLA-B8, DR3*, che è parte dell'aplotipo ancestrale (AH) 8.1 *HLA-A1, Cw7, B8, TNFAB*a2b3, TNFN*S, C2C, Bf*s, C4A*Q0, C4B*1, DRB1*0301, DRB3*0101, DQA1*0501, DQB1*0201*.

Tre componenti del sistema del complemento, il quale è il principale meccanismo effettore dell'immunità di tipo umorale ed è importante nella rimozione dei complessi immuni, opsonizzazione e lisi cellulare, sono codificati dalla regione di classe III. In particolare il gene C4 partecipa nella principale *pathway* che può essere attivata dal legame di C1 al complesso antigene-anticorpo. Molti cromosomi umani hanno due geni C4, ovvero C4A e C4B. Entrambi gli isotipi di C4 sono altamente polimorfici e l'aplotipo 8.1 presenta un singolo segmento caratterizzato da nessun gene C4A. L'allele nullo non codifica per una proteina funzionale. Questo difetto genetico potrebbe permettere la prolungata persistenza di agenti immunizzanti che possono portare ad una maggiore produzione di auto-anticorpi diretti contro le cellule che hanno subito l'apoptosi e che non sono distribuite bene a causa di una ridotta rimozione antigenica (Candore et al., 2002). Inoltre, da recenti studi emerge che l'aplotipo 8.1 potrebbe influire sul decorso clinico della fibrosi cistica ritardando l'inizio della colonizzazione di *Staphylococcus aureus* e/o *Pseudomonas aeruginosa*, evento che porta successivamente all'infezione cronica del polmone presente nella maggior parte dei pazienti che soffrono di questa patologia. Il rallentamento della colonizzazione si ha probabilmente grazie ad una più efficiente risposta immunitaria contro le infezioni batteriche. Questa alterazione della risposta immunitaria di tipo genetico è caratterizzata da maggiori livelli di anticorpi, auto-anticorpi, complessi immuni circolanti e TNF α (Toth et al., 2007). Pertanto si pensa che nel corso dell'evoluzione sia stata vantaggiosa contro le infezioni e questo spiegherebbe la diffusione nella popolazione caucasica. Infatti, è stato ipotizzato che gli antenati nord europei colonizzarono ambienti distanti rispetto ai luoghi africani (sede d'origine della vita umana) e questo cambiamento di habitat sarebbe stato accompagnato dall'aumentata selezione dovuta a climi rigidi e forse alla diminuzione di pericolo d'

infezione. Così, i geni codificanti 8.1 AH sarebbero potuti diventare frequenti conferendo una maggiore resistenza alle malattie infettive. Un' iper-reattività determinata geneticamente potrebbe dotare un individuo di una maggiore resistenza alle infezioni, sebbene allo stesso tempo conferiscono un aumento del rischio di autoimmunità (Candore G et al., 2002). Sembra emergere, inoltre, anche un'interessante associazione fra la longevità e l'aplotipo 8.1. Questa associazione con gli alleli di HLA o aplotipi di diversi geni, correlati a fattori di rischio per una varietà di malattie (malattie cardiovascolari e cancro), sembra essere un fattore di longevità sesso-specifico (per il genere maschile). Tutto ciò potrebbe essere interpretato come prospettiva di una nota teoria evuzionaria sull'invecchiamento (pleiotropia antagonistica): tale teoria predice che lo stesso gene (o allele o aplotipo) può avere diversi ruoli (positivi o negativi) in diversi periodi della vita. Pertanto l'aplotipo 8.1 dovrebbe esercitare un effetto positivo durante l'infanzia e l'invecchiamento, ma non durante la maturità quando risulterebbe associato alla suscettibilità ad un certo numero di malattie (Caruso et al. 2000) (tab. 1, 2).

1.5 IL GENE *TNF ALFA* ED I SUOI POLIMORFISMI

Il gene *TNF- α* è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (6p21.3) tra i geni *HLA-B* e *DR* all'interno della regione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe III (Carroll MC., 1987; Höhler T et al., 2002;), occupa circa tremila basi e contiene 4 esoni. L'ultimo esone codifica l'80% degli amminoacidi riscontrabili nella proteina finale. (Nedwin GE et al., 1985)

L'espressione di tale gene comporta la sintesi di *TNF- α* (Fattore di Necrosi Tumorale alfa). Il *TNF* è prodotto, dapprima, come una proteina transmembrana di tipo II lunga 212 amminoacidi e arrangiata in uno stabile omotrimerico. Da questa forma legata alla membrana, diventa una citochina solubile omotrimerica (s*TNF*) grazie al taglio proteolitico di un metalloproteasi detta enzima convertitore il *TNF* alfa (ossia *TACE*). La forma trimerica solubile, del peso di 51 kDa, tende a dissociarsi per concentrazioni inferiori all'ordine delle nanomoli, perdendo la sua bioattività (Aggarwal et al., 1985).

Il *TNF- α* è una delle molteplici citochine pro-infiammatorie che giocano un ruolo centrale nell'iniziazione e nella regolazione della cascata delle citochine durante la risposta infiammatoria (Herrmann et al., 1998). Inoltre, la citochina *TNF- α* agisce su numerosi organi e sistemi, assieme a *IL-1* e *IL-6*: sul sistema cardiocircolatorio, diminuisce la pressione, aumentando la vasodilatazione; diminuisce la contrattilità del miocardio; induce la formazione di trombi (creando la cosiddetta C.I.D. ossia coagulazione intravascolare disseminata), aumenta la resistenza all'insulina; aumenta il catabolismo proteico nel muscolo e quello lipidico nel tessuto adiposo; induce l'apoptosi di vari tipi cellulari. Elevati livelli di *TNF- α* sono associati a molte malattie infiammatorie come l'artrite reumatoide e malattie infiammatorie intestinali,

e gli inibitori del TNF- α sono ampiamente usati per curarle (Baugh e Bucala, 2001; Furst et al., 2003).

Nel promotore del gene *TNF α* sono stati identificati diversi SNPs (Fig. 4), alcuni dei quali influiscono nella regolazione dell'espressione del gene stesso; in particolare, questi polimorfismi sono situati nella posizione -238 (D'Alfonso S. e Richiardi PM., 1994; Waldron-Linch et al., 1999); -308 (Wilson et al. 1997), -857 (Herrmann et al. 1998); -863 e -1031 rispetto al sito di inizio della trascrizione (Higuchi et al., 1998). In particolare, il polimorfismo G-308A del gene *TNF- α* è un polimorfismo di una singola coppia di basi situato in posizione -308 nella regione promotore del gene *TNF- α* e consiste nella sostituzione del nucleotide guanina (G) con una adenina (A) (Lakka et al., 2005; Kroeger et al., 1997; Wilson et al., 1997). Tale polimorfismo influisce sul tasso di trascrizione del gene *TNF- α* , essendo l'allele A responsabile di una trascrizione del gene corrispondente al doppio rispetto a quella data dall'allele *wild type*, con successivo incremento nella produzione di TNF- α (Joffe YT et al., 2010).

La presenza del polimorfismo comporta una maggiore predisposizione o una maggiore incidenza di diverse malattie metaboliche croniche, degenerative, malattie infiammatorie e autoimmuni (Cuenca et al., 2001). Ad esempio, è stato evidenziato un ruolo importante per la variante G-308A nella patogenesi dell'obesità e dell'insulino-resistenza associata all'obesità (Fernandez-Real et al., 1997; Walston et al., 1999; Hoffstedt et al., 2000; Brand et al., 2001). In particolare è stata riscontrata una associazione tra il polimorfismo -308G>A e lo sviluppo di obesità nei bambini (Popko K et al., 2009). Inoltre, questo polimorfismo sembra anche essere associato con la malaria cerebrale. Si pensa infatti che il *TNF α* abbia un ruolo importante nella patogenesi di gravi malattie infettive e la malaria cerebrale è associata con alti livelli

circolanti di questa citochina. In uno studio caso-controllo fra i bambini del Gambia si è trovato che gli omozigoti per l'allele *TNF2*, una variante della regione del promotore del gene *TNF α* , hanno un rischio relativo pari a 7 di morte o gravi conseguenze neurologiche dovute alla malaria cerebrale. Sebbene l'allele *TNF2* sia in *linkage disequilibrium* con parecchi alleli *HLA* ad esso adiacenti, si dimostra che questa associazione con la malattia dipende da variazioni nel HLA di classe I e classe II. Questi dati suggeriscono che i polimorfismi regolatori dei geni della citochina possano influenzare il risultato di gravi infezioni. Il mantenimento dell'allele *TNF2* ad una frequenza genica di 0.16 in Gambia implica che il maggiore rischio di malaria cerebrale negli omozigoti sia controbilanciato da alcuni benefici biologici (McGuire W et al., 1994). Altra associazione è quella fra *TNF α* e una forma severa di leishmaniosi cutanea. L'analisi di lesioni in pazienti affetti da questa patologia ha infatti messo in evidenza la presenza di una miscela di mRNA di citochine Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- β) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) (Pirmez et al., 1993; Caceres-Dittmar et al., 1993), nonché anche mRNA di *TNF α* che potrebbe essere correlato con la regolazione genetica della produzione di citochine. Sono stati descritti due polimorfismi: uno in posizione -308 nella regione del promotore del gene *TNF α* , per il quale l'allele 2 è associato con maggiori livelli costitutivi e inducibili di *TNF α* , e nell'introne 2/esone 3 del gene *TNF β* , con i due alleli polimorfici variabilmente associati con livelli alti e bassi di secrezione di *TNF α* . Si dimostra che la suscettibilità alla forma mucocutanea di questa patologia possa essere direttamente associata con i polimorfismi regolatori che influenzano la produzione di *TNF α* (Cabrera M et al., 1995). Data la possibile implicazione di *TNF α* nella patofisiologia cardiovascolare è possibile ipotizzare che i polimorfismi del gene *TNF α* possano essere associati con una predisposizione con le malattie cardiache coronariche

(Herrmann et al., 1998). Il polimorfismo *TNF- α* -308G>A è stato associato all'irritazione della pelle: individui con il genotipo mutato AA ed eterozigote GA hanno una più bassa frequenza di essere soggetti a fenomeni di irritazione cutanea rispetto agli individui con il genotipi selvatico GG per il locus *TNF- α* (Davis, 2010). In particolare numerosi studi hanno messo in evidenza la presenza di una forte associazione tra il polimorfismo -308G/A e *l'acne vulgaris*.

1.5.1 Il gene *TNF α* e *l'acne vulgaris*

L'acne è una malattia multifattoriale cronico-infiammatoria dell'unità pilo-sebacea che interessa principalmente gli adolescenti e i giovani adulti, è caratterizzata da un processo infiammatorio del follicolo pilifero e della ghiandola sebacea annessa e determina la formazione di papule e pustole derivanti dalla lesione originaria: il comedone. L'acne *vulgaris* è la forma più diffusa e viene comunemente chiamata acne. Numerosi polimorfismi sono stati associati ad una maggiore suscettibilità di sviluppare l'acne; tra questi, i più conosciuti risiedono all'interno del gene *TNF α* , localizzato nella regione altamente polimorfica MHC III; la maggior parte degli SNPs in questo locus genico interessano la regione di regolazione 5' mentre la regione 3' presenta un più alto tasso di conservazione (Waldron et al., 1999). I diversi polimorfismi a singolo nucleotide del gene *TNF α* (-103 T>C, -857 C>T, -863C>A, -308G>A, -238G>A) sono determinanti nello sviluppo delle reazioni infiammatorie dell'*acne vulgaris*. Negli ultimi anni diversi studi hanno valutato l'associazione tra i polimorfismi del gene *TNF α* e la suscettibilità all'*acne vulgaris*. Infatti è stato dimostrato che l'allele T del polimorfismo -857C>T del gene *TNF α* agisce come un fattore protettivo per l'acne mentre l'allele A del polimorfismo -308G>A è presente con una maggiore frequenza nelle donne affette da acne rispetto

ai controlli sani. Il polimorfismo -308 G>A del gene *TNF α* , determina un aumento della suscettibilità alle malattie cronicoinfiammatorie (Ateo et al., 2006; Ates et al. 2007; Cuenca et al., 2001; D'Alfonso et Richiardi 1994; Kim et al., 2003; Sullivan et al, 1997; Vowels et al., 1995). Uno studio recente ha analizzato l'associazione tra questo polimorfismo e l'*acne vulgaris* riscontrando la presenza di una positiva correlazione tra l'allele recessivo -308 A e l'acne solo nel genere femminile (Szabò et al. 2010). Negli ultimi anni, diversi studi hanno riscontrato una precoce insorgenza dell'acne, ossia la comparsa della malattia in giovani pazienti di età compresa tra gli 8 e i 9 anni. Questa osservazione clinica è stata sostenuta da studi epidemiologici che suggeriscono una diminuzione dell'età media della pubertà. Un recente studio ha analizzato le tendenze di esordio puberale e il rapporto di queste con l'indice di massa corporea (BMI), dimostrando che l'inizio dell'età media della pubertà tra i giovani è in netta diminuzione. A tal proposito studi condotti negli Stati Uniti ritengono che l'alimentazione possa essere una spiegazione per l'esordio della pubertà, e che l'obesità possa contribuire ad un cambiamento nello stato puberale e nella presentazione dell'acne (Sheila et al., 2010).

1.6 LA SALUTE RIPRODUTTIVA

Il termine “salute riproduttiva” è comparso circa quarant'anni fa' nei testi di diverse agenzie delle Nazioni Unite, si potrebbe pensare che l'espressione indichi essenzialmente l'assistenza preventiva e le cure disponibili per le donne durante la gravidanza, o durante e dopo il parto, o anche il trattamento terapeutico disponibile nei casi di sterilità, o di malattie sessualmente trasmesse. In realtà l'espressione “salute riproduttiva” ha vari significati.

“La salute riproduttiva è uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale, e non soltanto assenza di malattia o infermità, in tutti i contesti riguardanti il sistema riproduttivo, le sue funzioni e i suoi processi. La salute riproduttiva, quindi, implica che le persone siano in grado di avere una vita sessuale soddisfacente e sicura, la capacità di riprodursi e la libertà di decidere se, quando e quanto riprodursi. In quest'ultima condizione è implicito il diritto degli uomini e delle donne di essere informati e di avere accesso a metodi di pianificazione familiare sicuri, efficaci, disponibili e accettabili secondo la loro scelta così come altri metodi per la regolazione della fertilità che non siano contrari alla legge ” (*International Conference on Population and Development*, 1994).

Uno dei grandi temi di Sanità Pubblica è la tutela della salute materno infantile fin dal momento del concepimento. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato gli “*Standard per l'assistenza perinatale*” (*Standards for Maternal and Neonatal Care*) (WHO, 2006), questi sono gli interventi che possono migliorare l'efficacia e la sicurezza in gravidanza, durante il parto e nell'assistenza al neonato. Con questo documento, ancora una volta, sono stati confermati alcuni tra i 21 obiettivi presentati nel documento “21 obiettivi per il 21° secolo”(WHO, 1999), in cui veniva considerata la salute materno infantile, tra cui:

- “**Obiettivo 2:** Importanti elementi della salute di un adulto si trovano nel suo corredo genetico, nella vita prenatale e nell'infanzia. Le consulenze genetiche e dietologiche, una gravidanza senza fumo, adeguate visite prenatali e consigli appropriati aiutano a prevenire neonati di basso peso e anomalie congenite”.
- “**Obiettivo 3:** La salute inizia con la vita. Tutti gli Stati Membri dovrebbero assicurare tutti gli interventi per un'appropriata salute riproduttiva. Dal momento che investimenti precoci in salute possono compensare un inizio di vita problematico e produrre successivamente dei vantaggi, le politiche della salute hanno la necessità non solo di fornire reti orientate alla sicurezza, ma anche “trampolini” per controbilanciare gli svantaggi precedenti”.

Il progressivo invecchiamento del nostro Paese caratterizzato da una diminuzione della natalità e l'aumento dell'età media delle donne alla nascita del primo figlio, ai giorni nostri impongono una maggiore attenzione all'idea del concepimento fino all'evento della nascita. Ad oggi si registra ancora una scarsa conoscenza e attuazione di pratiche preventive, talvolta anche molto semplici, quali l'uso di integratori alimentari durante la gravidanza e la prevenzione mediante vaccinazione di malattie che non sono pericolose al di fuori della gravidanza e che invece diventano molto rischiose per il neonato se contratte subito prima o durante il periodo gestazionale.

Anche l'adozione di stili di vita salubri nel periodo preconcezionale e durante la gravidanza assume un'importanza notevole per evitare problemi al neonato.

La promozione della salute è il processo che permette di aumentare il controllo sulla propria salute e di migliorarla.

Il controllo e il miglioramento della salute, quindi, si fondano sulla diffusione delle conoscenze tra i soggetti interessati. Ogni Operatore Sanitario che viene a contatto con la donna durante la sua vita riproduttiva, dovrebbe fornire informazioni relative alla buona preparazione di una gravidanza.

Un importante elemento della salute riproduttiva è una sana alimentazione delle donne in età fertile. L'età fertile rappresenta uno specifico periodo nella vita di una donna in cui l'adeguato *intake* di micronutrienti è importante per la donna stessa, ma anche per il sano sviluppo fetale del suo nascituro. È stato riconosciuto che il *deficit* di diversi micronutrienti può contribuire ad uno sviluppo anormale prenatale e/o all'*outcome* di gravidanza. Questi includono *deficit* di folati, ferro e iodio (Allen LH, 2005).

1.6.1 Il ruolo della donna nella sana alimentazione

Una sana alimentazione durante i primi anni di vita è alla base di un buono stato di salute durante il corso di tutta la vita ed investire nelle prime fasi di sviluppo di un bambino è uno dei migliori investimenti che un Paese possa fare. Questo inizia con l'alimentazione materna durante la gravidanza, infatti, un basso peso alla nascita aumenta il rischio di malattie croniche durante il corso della vita. Quindi, una sana alimentazione durante la gravidanza e durante l'allattamento ha conseguenze sociali ed economiche a lungo termine. Gli interventi di educazione alla salute e le Politiche Sanitarie che hanno come *target* le donne, specialmente in età fertile, possono portare ad un significativo guadagno di salute nel Paese.

Il ruolo della donna nella salute nutrizionale include l'alimentazione dei nuovi nati, la preparazione dei pasti quotidiani per tutti i membri della sua famiglia ed il suo coinvolgimento professionale, nelle cure e la sua educazione. Tradizionalmente, le

donne sono le responsabili dell'acquisto degli alimenti e della preparazione dei pasti. Così la competenza di una donna riguardo una sana alimentazione determinerà un buono stato di salute della sua famiglia e di conseguenza della società. Quindi, si può affermare che la donna ha un ruolo chiave nell'assicurare una sana alimentazione. Lo stato di salute di una donna così come la sua posizione sociale ha un grande impatto sulla salute dei suoi figli e quindi della generazione futura. (WHO, 2000).

1.6.2 I fabbisogni nutrizionali delle donne in età fertile

L'età fertile della donna comincia dalla prima mestruazione e finisce con la menopausa. In media, il periodo in cui una donna è fertile, va dai 12 ai 49 anni. La fertilità subisce variazioni dovute all'età e allo stile di vita. Lo stato nutrizionale prima, durante e dopo la gravidanza è basilare anche per la donna stessa, con possibili effetti sia a breve termine che a lungo termine. L'età fertile nelle donne costituisce un periodo d'indubbio rischio nutrizionale dato l'elevato fabbisogno di energia e nutrienti sufficienti per il mantenimento del suo buono stato di salute, così come quello del feto (*National Institute for Health & Clinical Excellence, 2005*).

La valutazione dello stato nutrizionale nelle donne in età fertile è essenziale per la comprensione delle basi scientifiche di questo tema, e per lo sviluppo di politiche di Sanità Pubblica coerenti ed appropriate. La qualità della dieta durante il periodo pre- e periconcezionale è fondamentale, poiché è associata con gli *outcome* di gravidanza (aborto spontaneo ricorrente, ritardo di crescita intrauterina, pre-eclampsia, distacco della placenta e anemia megaloblastica) (*Medical Research Council Vitamin Study Research Group, 1991; Scholl & Johnson, 2000*).

Nelle società sviluppate molte donne hanno una dieta qualitativamente povera, che può dar luogo da un lato a carenze nutrizionali, e dall'altro a sovrappeso e/o obesità.

Efficaci interventi sono necessari per migliorare l'alimentazione delle giovani donne in età fertile in molte società. Diete poco sane sono più comuni tra le donne con un basso livello d'istruzione, e tra le donne che hanno un reddito basso. L'educazione e la consulenza nutrizionale hanno dimostrato un miglioramento delle conoscenze e del comportamento nutrizionale tra le donne. Le conoscenze sui meccanismi attraverso i quali la nutrizione materna ha effetti a lungo termine sulla salute del nascituro sono limitate, ma vi sono forti prove rilevanti, da studi condotti su animali, che dimostrano come il cambiamento della nutrizione in gravidanza può produrre effetti positivi sulla prole. Pertanto è necessario garantire che le giovani donne in età fertile comprendano l'importanza della salute e del benessere prima della gravidanza, facendo attenzione alla dieta, al mantenimento del peso corporeo, a non fumare e a limitare il consumo di alcool. È stato dimostrato recentemente che, spesso nelle donne in età fertile, la dieta pur soddisfacendo il consumo calorico risulta essere povera di micronutrienti e vitamine, come i folati. Inoltre, un problema emergente anche nei Paesi in via di sviluppo è l'eccessiva nutrizione e gli effetti avversi che questa causa. Quindi, una nutrizione sbilanciata può derivare sia da un'assunzione inadeguata che eccessiva, ed entrambe possono esistere contemporaneamente. Le numerose funzioni delle sostanze nutritive in un'adeguata dieta sono fondamentali per l'integrità del metabolismo e per la crescita, per la funzione riproduttiva e per il mantenimento delle buone condizioni di salute (*Board of Science*, 2009).

1.7 L'OBESITA' COME MALATTIA MULTIFATTORIALE

Nonostante il grado di malnutrizione esistente sul pianeta, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica nel mondo, caratteristici dei paesi industrializzati e non solo, infatti, si è di fronte ad una vera e propria epidemia globale, che si sta diffondendo in molti Paesi e che può causare, in assenza di un'azione immediata, problemi sanitari molto gravi nei prossimi anni (Istituto Superiore di Sanità, 2011). Questo solleva una delle più attuali questioni di salute pubblica: l'obesità ed il sovrappeso aumentano il rischio di severe patologie croniche, quali il diabete di tipo 2, patologie cardiovascolari, ipertensione ed infarto, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, artrite, asma ed alcune forme di tumore (Mokdad et al., 2003)

Sfatando un luogo comune abbastanza diffuso, l'obesità non è un “problema dei ricchi”; o almeno, non solo: le fasce di popolazione più svantaggiate dal punto di vista socioeconomico tendono infatti a consumare più carne, grassi e carboidrati, piuttosto che frutta e verdura, e a curare meno la propria immagine e il benessere fisico. A livello psicologico, l'obesità può stravolgere completamente la vita di una persona: chi è obeso spesso viene isolato e sottoposto a una vera e propria stigmatizzazione sociale, che rende difficile qualunque tipo di socialità (Istituto Superiore di Sanità, 2011).

L'obesità è una malattia cronica a basso grado infiammatorio, associata ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari, diabete, sindrome metabolica e diversi tipi di cancro (Maury E e Brichard SM., 2010).

L'obesità è caratterizzata dall'accumulo di lipidi nel tessuto adiposo bianco. Il tessuto adiposo bianco è un tessuto connettivo specializzato composto da numerosi tipi cellulari, ciascuno con funzioni specifiche (DiGirolamo et al., 1998). Fino a

pochissimo tempo fa, il ruolo del tessuto adiposo nello sviluppo di obesità e delle sue conseguenze era considerato semplicemente di tipo passivo e gli adipociti non erano ritenuti altro che cellule per il deposito di grasso. Ora invece gli adipociti sono riconosciuti come componenti critici del controllo metabolico ed il tessuto adiposo come un organo endocrino con effetti sia positivi che negativi. Questa consapevolezza ha permesso di definire più chiaramente il ruolo che gli adipociti svolgono sia in condizioni di buona salute che di obesità. Comunque, a livello molecolare, si è ancora all'inizio della comprensione di come alcune variabili quali il controllo ormonale, l'esercizio fisico, l'introduzione del cibo e come varianti genetiche interagiscano tra loro e siano in grado di produrre un determinato fenotipo (Mokdad et al., 2003).

Il tessuto adiposo può essere diviso nella frazione degli adipociti e nella frazione dello stroma vascolare. La frazione degli adipociti è composta da cellule mature degli adipociti che svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi energetica di tutto il corpo (DiGirolamo et al., 1998). La frazione dello stroma vascolare è composta da numerosi tipi di cellule, tra cui preadipociti, cellule staminali mesenchimali, macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti, tutti elementi che possono svolgere un ruolo nel regolare l'infiammazione del tessuto adiposo (Nair et al., 2005). E' stato dimostrato, che negli obesi il tessuto adiposo bianco è infiltrato da numerosi tipi di cellule infiammatorie (Mutch et al., 2009; Divoux et al., 2010). In particolare, una maggiore produzione di adipociti con infiltrazione dei macrofagi comporta la secrezione di adipochine pro-infiammatorie che favoriscono la lipolisi e quest'ultima comporta un accumulo di lipidi a livello epatico e una variazione dei livelli plasmatici di glucosio ed insulina (Gustafson B., 2010; Karastergiou e Mohamed-Ali, 2010; Momiyama et al., 2010).

Va ricordato infine che la recente letteratura ha sempre più sottolineato la fondamentale differenza tra obesità di tipo viscerale e obesità di tipo sottocutaneo. L'obesità viscerale o intraddominale, che si manifesta clinicamente con un aumento della circonferenza vita, si è dimostrata, infatti, correlare perfettamente con comorbidità gravi quali l'insulino-resistenza, l'intolleranza al glucosio, l'ipertensione, la dislipidemia aterogenica, l'ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, alte concentrazioni di particelle LDL piccole e dense, stato trombotico e profilo infiammatorio generalizzati (Mokdad et al., 2003). L'obesità si pensa possa essere anche il risultato di fattori di rischio di natura genetica, infatti, data la natura multifattoriale dell'obesità, è probabile che esistano fattori genetici combinati in grado di favorire o meno la capacità di perdere peso e di mantenerlo basso (Istituto Superiore di Sanità, 2011). Centinaia di geni sono stati studiati per cercare di definire il fenotipo obeso; tuttavia, l'attuale mancanza di comprensione delle numerose interazioni gene-gene e gene-ambiente riguardante l'obesità rappresenta uno degli ostacoli principali per lo sviluppo di efficaci interventi preventivi e terapeutici. Lo stile di vita come la dieta e l'esercizio fisico, inoltre, hanno un ruolo importante nel modificare l'insorgenza, lo sviluppo e la gravità dell'obesità. L'eterogeneità nel fenotipo obeso deriva, quindi, dalla genetica, dallo stile di vita e dai fattori comportamentali (Andresen RE., 2000; Ebbeling et al., 2002)

1.7.1 Le alterazioni lipidiche nella popolazione in sovrappeso o obesa

In stato di sovrappeso/obesità in genere, vi è una franca ipertrigliceridemia, dal punto di vista funzionale questa alterazione ha una causa, e una serie di implicazioni metaboliche, ormai ben note. La presenza di ipertrigliceridemia è infatti in genere conseguenza dell'elevato afflusso di acidi grassi liberi al fegato, che nel paziente con

sovrappeso o obesità è attribuibile alla riduzione della sensibilità delle lipasi del tessuto adiposo all'azione inibitoria (antilipolitica) dell'insulina. Questo aumentato afflusso di acidi grassi liberi al fegato comporta un'aumentata sintesi e rilascio di lipoproteine nel circolo sistemico (si tratta delle cosiddette *very low density lipoproteins* o VLDL) e quindi in una serie di alterazioni a catena delle caratteristiche delle lipoproteine stesse che esita in un pattern di riconosciuta aterogenicità. L'elevata quantità e la relativa ricchezza in trigliceridi delle VLDL (le lipoproteine, come si ricordava, sintetizzate dal fegato ed immesse in circolo) comporta infatti una maggiore presenza degli stessi trigliceridi anche nelle lipoproteine a densità intermedia (IDL) e soprattutto nelle LDL che derivano dalle VLDL (Despres e Krauss, 1998; Superko HR, 1996). Inoltre, l'ipertrigliceridemia attiva un meccanismo enzimatico di scambio, mediato da un enzima denominato CETP (*cholesteryl ester transfert protein*) che scambia esteri del colesterolo con trigliceridi. In presenza di un eccesso di trigliceridi nelle VLDL questa via è particolarmente attiva, con il risultato di un ulteriore passaggio di trigliceridi verso le LDL e le HDL, bilanciato dal punto di vista molecolare dal passaggio di esteri del colesterolo in senso inverso (dalle LDL e dalle HDL verso le VLDL). I trigliceridi, a differenza degli esteri del colesterolo, sono tuttavia metabolicamente poco stabili e in particolare sono attaccabili dalle lipasi presenti nel circolo ematico o a livello della parete capillare (sia la lipasi lipoproteica o LPL, sia la lipasi epatica o HL). L'idrolisi dei trigliceridi, presenti in eccesso nelle LDL nel paziente sovrappeso o obeso per i meccanismi appena ricordati, porta, come conseguenza, ad una sorta di svuotamento del nucleo lipidico delle LDL stesse, e a una conseguente diminuzione del loro volume. La riduzione del contenuto di trigliceridi, caratterizzati come è noto da una densità piuttosto bassa, aumenta inoltre anche la densità delle lipoproteine LDL così

modificate, formando particelle più piccole e più dense, denominate appunto *small-dense LDL* dagli autori anglosassoni. E' importante sottolineare che le *small-dense LDL* sono notoriamente più aterogene delle LDL normali, più ampie e più leggere: probabilmente per la loro maggiore capacità di penetrare nel subendotelio (grazie alle ridotte dimensioni), ma anche – e soprattutto – per la loro limitata capacità di resistere allo stress ossidativo, che le porta a convertirsi, soprattutto nello strato sottoendoteliale della parete arteriosa, in LDL ossidate, in grado di attivare i meccanismi della chemiotassi, la penetrazione di cellule infiammatorie ed, in ultima analisi, i meccanismi dell'aterogenesi (Grundy SM., 2004; Ross R., 1999). Anche le lipoproteine HDL sono soggette all'arricchimento in trigliceridi mediato dalla CETP e, successivamente, all'attacco delle lipasi (specie la lipasi epatica): anch'esse tendono quindi ad avere dimensioni ridotte nei soggetti in sovrappeso o obesi. Questa modificazione strutturale sarebbe inoltre associata a una perdita dell'attività antiaterogena che caratterizza queste particelle in condizioni normali. Il progressivo svuotamento della particella dell'HDL, tra l'altro, facilita la perdita per via renale dell'ApoA-I, la principale apolipoproteina costitutiva delle HDL stesse: il che implica, di fatto, una diminuzione dei loro livelli nel plasma. La presenza di bassi valori della colesterolemia HDL nei pazienti con sovrappeso/obesità è infatti un dato relativamente costante (Verges et al., 2006). Dal punto di vista generale, è interessante osservare a questo proposito che le alterazioni lipoproteiche prima ricordate (aumento della trigliceridemia e riduzione dei valori del colesterolo HDL) sono decisamente più rappresentate tra i soggetti con obesità viscerale rispetto ai soggetti con obesità semplice. E' interessante notare che il calo di peso, comunque ottenuto, tende a migliorare il profilo lipidico del paziente, riducendo la trigliceridemia, aumentando la colesterolemia HDL e modificando il *pattern* delle

lipoproteine LDL dal fenotipo a maggiore densità e minori dimensioni prima ricordato (fenotipo aterogeno o B) verso il fenotipo a maggiore dimensione e minore densità (fenotipo non aterogeno o A). Il calo del peso corporeo contribuisce quindi anche a migliorare la dislipidemia aterogena che contribuisce in maniera determinante al rischio coronarico di questi pazienti.

Infine, è ancora opportuno ricordare che alcuni dei componenti della tipica alimentazione moderna sono in grado di influenzare sfavorevolmente questi parametri lipidici, e vanno pertanto selettivamente ridotti (al di là dell'esigenza ovvia di controllare l'apporto calorico totale) nel paziente con sovrappeso o obesità. Gli acidi grassi insaturi della serie *trans*, caratterizzati dalla presenza di almeno un doppio legame con questa conformazione, probabilmente per la loro capacità di legarsi con effetto inibitorio sui recettori nucleari denominati PPAR alfa, hanno per esempio una documentata capacità di ridurre la colesterolemia HDL; il loro consumo va quindi ridotto, e se possibile eliminato, nei soggetti con sovrappeso e obesità. Il consumo di acidi grassi della serie *trans*, inoltre, si associa ad una progressiva attivazione dei fenomeni della flogosi, documentati da un aumento dei livelli della PCR passando da consumi relativamente bassi (l'1% dell'energia totale) fino a consumi relativamente elevati (il 3% circa del totale): un fenomeno che si sovrappone, peggiorandolo, all'aumento dei livelli degli stessi indicatori di infiammazione che si osserva, di per sé, in presenza di sovrappeso o obesità.

Sul piano del consumo dei carboidrati è invece essenzialmente l'indice glicemico dei carboidrati stessi a condizionare il loro effetto sul profilo lipidico: il consumo di carboidrati ad alto indice glicemico (alcuni zuccheri semplici come il glucosio, ma anche alcuni amidi ad elevata digeribilità come le patate o il pane) si associa infatti ad un aumento della trigliceridemia, ad una riduzione della colesterolemia HDL, ad

un aumento dei livelli plasmatici della proteina C-reattiva (PCR). La scelta di amidi a basso indice glicemico rappresenta quindi probabilmente l'opzione più interessante per il paziente con sovrappeso o obesità, anche con l'obiettivo di migliorare il suo profilo lipidico. Il consumo di alimenti, e specificamente di amidi ad alto indice glicemico si associa infatti a un rapido rilascio di glucosio nell'intestino e a un rapido aumento della glicemia che, in assenza di un rapido impiego del glucosio ottenuto con obiettivi energetici, induce ipertrigliceridemia e aumento dello stress ossidativo. In conclusione, il paziente con sovrappeso/obesità presenta in genere una tipica alterazione del profilo lipidico, caratterizzata da ipertrigliceridemia, bassi valori del colesterolo HDL, LDL non aumentate quantitativamente ma con caratteristiche di maggiore densità e minori dimensioni (LDL piccole e dense) che contribuiscono in modo significativo all'aumentato rischio coronarico e cardiovascolare di questi pazienti. Anche l'adozione di specifiche scelte di natura dietetica, con l'eliminazione degli acidi grassi della serie trans ed il consumo preferenziale di alimenti a basso indice glicemico, può contribuire, oltre al controllo ponderale stesso, a migliorare questo importante aggregato di fattori di rischio cardiovascolare (Mozaffarian et al., 2006).

1.7.2 Il *TNF α* e l'obesità

L'espressione e i livelli circolanti del *TNF- α* aumentano con l'obesità e diminuiscono con la perdita di peso (Maury e Brichard, 2010). Il *TNF- α* è prodotto dai macrofagi in risposta ai segnali chemioattraenti rilasciati da adipociti morti (Trayhurn e Wood, 2004); ha numerosi effetti sul tessuto adiposo, compresa la regolazione dell' adipogenesi, il metabolismo lipidico e la resistenza all'insulina (Prins et al., 1997;. Galic et al., 2010). Inoltre, tale citochina innesca una cascata di

segnali che induce l'apoptosi delle cellule, che può essere un meccanismo attraverso il quale il *TNF- α* controlla la massa di tessuto adiposo (Prins et al., 1997; Cawthorn et al., 2007).

Il tessuto adiposo ha un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi del glucosio. Tale organo è infatti in grado di conservare l'energia metabolica sotto forma di trigliceridi (TG) durante lo stato di nutrizione e di rilasciarla sotto forma di FFA (acidi grassi liberi) nello stato di digiuno. Gli FFA rilasciati in circolo vengono infatti trasportati nei tessuti *target*, ossidati nei mitocondri e utilizzati come fonte energetica (Guilherme et al., 2008). L'alto livello di coordinazione tra il sistema infiammatorio e quello metabolico è particolarmente evidente in condizioni di obesità. Durante tale stato gli adipociti diventano ipertrofici (si allargano) a causa dell'aumentato accumulo di TG. In tale condizione gli adipociti possono secernere MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein- 1*), una molecola che stimola l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo (fig. 5). Sia gli adipociti che i macrofagi producono ulteriormente MCP-1 e altre chemochine, inoltre secernono il *TNF- α* (*Tumor necrosis factor- α*) e diverse citochine, come l'interleuchina 1 β (IL-1 β); avviando e potenziando una risposta infiammatoria. (Guilherme et al., 2008; Tilg & Moschen, 2006). Il *TNF- α* regola l'obesità geneticamente tramite due distinti recettori, il recettore 1 di *TNF- α* (TNFR1) e il recettore 2 (TNFR2). L'espressione del gene *TNFR2*, strettamente correlata con quella di *TNF- α* , è elevata nei soggetti obesi (Chagnon et al., 1997; Zhao et al., 2008). Comparando, infatti, i livelli di espressione di *TNFR2* nei soggetti normopeso e obesi, l'espressione di *TNFR2* risulta essere due volte maggiore nel tessuto adiposo e sei volte maggiore nel plasma delle donne obese. Il livello nel plasma di TNFR2 è, quindi, positivamente correlato con BMI, massa grassa, e rapporto vita-fianchi (Fernandez-Real et al., 1997). Studi

suggeriscono che un aumento del *TNF- α* promuove la secrezione di altre citochine pro-infiammatorie e riduce le citochine anti-infiammatorie: Wang e Trayhurn (2006) hanno dimostrato che il trattamento di adipociti umani con *TNF- α* per 24 ore ha portato ad una significativa diminuzione dell'espressione di adiponectina e aumenti di IL-6 e *TNF- α* . Inoltre, il *TNF- α* aumenta la produzione dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno, un'adipochina legata a malattie cardiovascolari (Cawthorn e Sethi, 2008). Il *TNF- α* è, quindi, un potente regolatore delle molecole infiammatorie e favorisce l'instaurarsi di uno stato infiammatorio generale (Wang e Trayhurn, 2006). Alti livelli di questa citochina sono anche associati a maggiori livelli di triacilgliceroli nel siero (TG), colesterolo VLDL e bassi livelli di colesterolo HDL circolante.

Il polimorfismo -308 G/A aumenta l'attività trascrizionale e la produzione di *TNF- α* (Wilson et al., 1997). L'allele A del polimorfismo -308G>A, infatti, è responsabile di una trascrizione del gene corrispondente al doppio rispetto a quella data dall'allele *wild type*, con successivo incremento nella produzione di *TNF- α* (Joffe YT et al., 2010). Da alcuni studi emerge che i portatori dell'allele A del polimorfismo -308G>A hanno una maggiore quantità di grasso corporeo ma un BMI simile; e mostrano una minore sensibilità all'insulina rispetto ai portatori GG (Fernández-Real et al., 1997); inoltre, fra i portatori dell'allele A ci sono più obesi rispetto ai non portatori (Herrmann et al. 1998).

1.7.3 Associazione tra *TNF α* , obesità e sesso

La *World Health Organization* definisce l'obesità come un problema che coinvolge prevalentemente le donne rispetto agli uomini. Recenti dati di sorveglianza della *National Health Nutrition Examination Survey* indicano che i tassi di obesità

(definita come un BMI ≥ 30 kg/m²) (WHO, 1995) nelle donne statunitensi hanno raggiunto il 33% (Ogden et al., 2006).

Le donne sono particolarmente vulnerabili all'aumento di peso in età fertile (Siega-Riz et al., 2004). Così, molte donne in gravidanza sono obese. L'obesità durante la gravidanza è considerata uno stato ad alto rischio, perché è associata con varie complicazioni. Le donne obese, comparate con le normopeso, hanno un maggior livello di infertilità. Dopo il concepimento, hanno un più elevato tasso di aborto spontaneo precoce e un più elevato tasso di anomalie congenite, tra cui i difetti al tubo neurale. Inoltre, le donne obese hanno una maggiore probabilità di avere una gravidanza con ipertensione, diabete gestazionale, trombo-embolia, macrosomia e decesso intrauterino spontaneo a metà gravidanza. Le donne obese hanno spesso la necessità di eseguire un parto cesareo e, quindi, una maggiore incidenza di infezioni alle ferite. Inoltre, i bambini nati da donne obese hanno una più alta suscettibilità all'obesità da adolescenti o da adulti. Poiché la gravidanza è il momento peggiore per perdere peso, le donne con un elevato indice di massa corporea dovrebbero essere incoraggiate a perdere peso prima del concepimento. I ricercatori hanno posto una crescente attenzione nel capire e chiarire i ruoli di eccessivo aumento di peso durante la gravidanza (Siega-Riz et al., 2004; Gore et al., 2003).

Molti studi hanno analizzato l'importanza del sesso associata alla presenza dell'allele A nel fenotipo obeso. In un ampio gruppo di soggetti svedesi, sia uomini che donne, con diverso BMI, si è osservato che la frequenza allelica non differiva significativamente tra individui obesi e non obesi di entrambi i sessi. Tra le donne, tuttavia, si è osservato che le portatrici del genotipo AA avevano un BMI medio di 10 kg/m² e un contenuto di grasso corporeo 1/3 maggiore rispetto alle portatrici del genotipo AG e GG, mentre negli uomini lo stesso polimorfismo non influenzava

questi due fattori in maniera statisticamente significativa. Sembra quindi che le donne omozigoti per la mutazione A nel promotore del gene *TNF- α* siano caratterizzate da un considerevole accumulo di grasso corporeo, e ciò potrebbe essere un fattore genetico comune per l'obesità nel genere femminile. L'obesità femminile è infatti associata in maniera meno frequente con l'accumulo di grasso addominale e i disturbi metabolici rispetto a quella maschile. Pertanto questo studio evidenzia come il polimorfismo -308G>A del gene *TNF- α* sia associato all'obesità femminile quando presente in stato di omozigosi (Hoffstedt et al., 1999).

Un altro studio su donne sudafricane ha messo in evidenza che sembra esserci anche una correlazione fra l'assunzione di grassi attraverso la dieta e il polimorfismo -308G>A del gene *TNF- α* nell'obesità. I risultati mostrano come il genotipo e la frequenza allelica del polimorfismo -308G>A non differiscono fra le donne normopeso e quelle obese. Sono state riscontrate tuttavia interazioni significative dieta-gene fra acido α -linoleico e rapporto colesterolo totale-colesterolo HDL, acidi grassi polinsaturi (PUFA) e livelli di colesterolo LDL (Joffe YT et al., 2010).

1.8 LA PROTEINA C-REATTIVA: *MARKER* DI INFIAMMAZIONE ACUTA E CRONICA

L'infiammazione è una risposta dell'organismo alle infezioni e/o a stimoli lesivi. La risposta infiammatoria locale è accompagnata da una risposta sistemica nota come risposta di fase acuta. Questa risposta è caratterizzata da febbre, aumentata sintesi di ormoni come ACTH (ormone adrenocorticotropo) e idrocortisone, aumentata produzione di globuli rossi nel sangue (leucocitosi) e produzione di un gran numero di proteine di fase acuta da parte del fegato. L'aumento della temperatura corporea inibisce la crescita di numerosi patogeni e potenzia la risposta immunitaria contro i patogeni.

La proteina C-reattiva (PCR) è una delle proteine di fase acuta, e il suo livello aumenta di 1000 volte. È stata isolata nel siero di pazienti affetti da polmonite pneumococcica e il suo nome deriva dalla capacità di precipitare il polisaccaride C della parete batterica di *Streptococcus polmonite* (Tillett et Francis; 1930). La PCR è un membro della famiglia delle pentatrassine, formata da cinque catene polipeptidiche identiche tenute insieme da interazioni non covalenti (Thompson D. et al., 1999). Nell'uomo, è una proteina non glicosilata il cui gene è stato mappato sul cromosoma 1 (Devaraj et al., 2005). La PCR circolante è sintetizzata e secreta prevalentemente dagli epatociti in risposta a citochine proinfiammatorie come il Fattore di Necrosi Tumorale (*TNF- α*), l'interleuchina-1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6) (Ablij et Meinders, 2002; Pepys et Hirschfeld, 2003). L'IL-6 aumenta la sintesi *de novo* di PCR incrementando la trascrizione dell'mRNA della PCR, e l'IL-1 β regola la sintesi della PCR mediante un incremento della traduzione (Nanri et al., 2007); queste citochine inoltre agiscono sull'ipotalamo inducendo una risposta febbrile. Poiché i livelli di PCR dipendono dall'azione combinata di IL-1, *TNF- α* e

IL-6, essa è stata valutata come un *marker* surrogato di questi mediatori dell'inflammation (Ridker PM. et al., 2000). La PCR lega molecole endogene ed esogene quali costituenti di microbi, lipoproteine native e modificate, cellule necrotiche e cellule apoptotiche; in questo modo attiva la via classica del complemento con conseguente deposizione della opsonina C3b sulla superficie dei microrganismi. I fagociti, che esprimono recettori per il C3b, possono quindi fagocitare rapidamente microrganismi e cellule necrotiche (Nanri et al., 2007; Kuby, Immunology, 2006).

La proteina C reattiva circolante è presente nel siero di soggetti sani in concentrazioni molto basse; valori di PCR superiori a 10 mg/L sono indicativi di infezione o inflammation subclinica (Pearson et al., 2003). Durante i processi infiammatori, il titolo della proteina C reattiva può raggiungere valori molto elevati, fino a 500-1000 mg/L. I test clinici standard rilevano le concentrazioni sieriche di PCR solo se uguali o superiori a 3-8 mg/L (Ridker, 2001); concentrazioni di PCR più basse, che fanno parte del cosiddetto *range* di normalità, possono essere misurate dal test ad alta sensibilità. Il limite di rilevamento minimo dell'*highsensitivity* PCR (hs-PCR) è notevolmente più basso e può arrivare a 0.04 mg/L (Jaye et Waites, 1997).

I livelli di proteina C reattiva non sono specifici per la diagnosi di malattia, ma servono a valutarne la gravità e l'evoluzione quando essa è già stata diagnosticata, a prescrivere esami più approfonditi per indagarne le origini o a valutare l'efficacia della terapia adottata. Una diminuzione a livello ematico della PCR in seguito a trattamento antinfiammatorio, per esempio, è indice di efficacia del percorso terapeutico. Poiché è una proteina di fase acuta, la PCR è soggetta a una serie di

modulatori diversi e varia a seconda delle diverse condizioni come fumo, artrosi, obesità, nonché in lesioni o infezioni (Araujo F. et al., 2004).

1.8.1 PCR: *marker* di rischio di malattie cronico-degenerative e obesità

Elevati livelli sierici di PCR sono stati associati con un aumento del rischio di infarto miocardico acuto, di ictus ischemico, di malattie alle arterie periferiche (Hu et al., 2004; Koenig et al., 1999; Ridker et al., 2003; Rost et al., 2001), pertanto la PCR può essere considerata un *marker* di rischio di malattie cardiovascolari (Pearson et al., 2003): un livello di hs-PCR superiore a 2,4 mg/L aumenta di due volte il rischio di coronaropatie rispetto ad un livello inferiore a 1 mg/L.

Alti livelli di PCR sono stati associati anche ad un incremento del rischio di diabete mellito di tipo 2 (DM), di tumore al colon-retto, ai polmoni e al seno; l'aumento di PCR si evidenzia pure in presenza di sindrome metabolica (Nanri et al., 2007).

Molti studi hanno dimostrato un'associazione tra obesità e livelli di PCR (Timpson et al., 2005; Visser et al., 1999); e la perdita di peso comporta una diminuzione delle concentrazioni di PCR (Dietrich e Jialal, 2005; Selvin et al., 2007). I macrofagi derivati dai monociti del tessuto adiposo in espansione promuovono lo stato infiammatorio attraverso un incremento nel plasma delle concentrazioni di citochine quali *TNF- α* e IL-6 che amplificano la sintesi epatica di PCR (Eckel et al., 2005). In concomitanza, l'alterazione delle funzioni endocrine nel tessuto adiposo che porta ad una produzione di ormoni adipocitari inclusi leptina, adiponectina, resistina e non solo, contribuisce a incrementare le disfunzioni metaboliche. Questo meccanismo innesca la cosiddetta *cascade of adversity*, attraverso cui l'obesità conduce a più alti livelli infiammatori e all'insorgenza di insulino-resistenza. La natura di questi collegamenti e le vie di progressione dell'infiammazione verso altri organi come

fegato, muscoli scheletrici o sistema vascolare, non sono ancora state individuate (Basu et al., 2010). In ogni caso, diventa importante la prevenzione delle malattie associate all'infiammazione controllando anche lo stato nutrizionale.

Studi recenti hanno analizzato l'obesità nei bambini in età scolastica (intorno ai 10 anni), evidenziando l'associazione tra PCR e BMI. All'aumentare del BMI, aumenta il rischio di obesità e crescono i livelli di PCR. Questi risultati suggeriscono quanto sia importante tenere sotto controllo il peso corporeo al fine di prevenire un incremento dei livelli sierici di PCR fin dall'età infantile, pertanto il BMI è considerato il più potente fattore predittivo della concentrazione sierica di PCR (Sadeghipour et al., 2010).

Alti livelli di PCR sono stati associati a BMI elevati anche in donne durante il primo trimestre di gravidanza (Kac et al., 2010) e possono rappresentare un rischio per l'insorgenza di diabete gestazionale (Wolf et al., 2003) e di preeclampsia (Wolf M et al., 2001; Qiu C et al., 2004).

È stato riportato che i livelli di PCR risultano progressivamente più bassi via via che crescono i livelli di sostanze antiossidanti introdotte con la dieta e stimate valutando il consumo totale di frutta e verdura. (Brighenti et al., 2005). La stessa vitamina C aiuta ad eliminare i radicali liberi, ed è anche in grado di rigenerare una forma ridotta di α -tocoferolo dal radicale tocoferossile formatosi per ossidazione (Pryor, 2000). Per cui, una dieta sana caratterizzata da un elevato apporto di vegetali, frutta, cereali integrali, e pollame, è correlata a bassi livelli di PCR; al contrario una dieta caratterizzata da un alto consumo di carni rosse e salumi, dolci, bibite, e cereali raffinati è correlata con una maggiore concentrazione di PCR nel sangue (Nanri et al., 2007).

1.8.2 Proteina C-reattiva e Fattore di necrosi tumorale- α

Come già descritto sopra, il Fattore di necrosi tumorale (TNF- α) è una citochina pro infiammatoria prodotta principalmente dai monociti e dai macrofagi; è considerata anche come il più forte attivatore paracrino di monociti e macrofagi. Il TNF- α agisce sulle cellule endoteliali dei vasi e sui macrofagi, inducendo la secrezione di fattori che stimolano l'ematopoiesi e inducono un aumento transitorio del numero dei globuli bianchi, necessario per combattere l'infezione (Schreyer et al., 1996). Il TNF- α agisce su numerosi organi e sistemi, assieme a IL-1 e IL-6: sul sistema cardiocircolatorio, diminuisce la pressione, aumentando la vasodilatazione; diminuisce la contrattilità del miocardio; induce la formazione di trombi (creando la cosiddetta C.I.D. ossia coagulazione intravascolare disseminata), aumenta la resistenza all'insulina; aumenta il catabolismo proteico nel muscolo e quello lipidico nel tessuto adiposo; induce l'apoptosi di vari tipi cellulari. Elevati livelli di TNF- α sono associati a molte malattie infiammatorie come l'artrite reumatoide e malattie infiammatorie intestinali, e gli inibitori del TNF- α sono ampiamente usati per curarle (Baugh e Bucala, 2001; Furst et al., 2003).

TNF- α e PCR sono entrambi presenti in quantità considerevoli nelle lesioni aterosclerotiche (Torzewski et al., 1998; Clausell et al., 1999), e sono stati associati con un aumento del rischio cardiovascolare in numerosi studi basati su grandi popolazioni (Koenig W., 2001; Plutzky J., 2001). In particolare, i livelli sierici di TNF- α sono stati collegati a malattie cardiovascolari quali aterosclerosi carotidea in uomini sani (Skoog et al., 2002), e a un aumentato rischio di eventi coronarici recidivi in sopravvissuti di infarto miocardico (Ridker et al., 2000). Rispetto al TNF- α , la PCR ha una emivita molto più lunga, superiore a 24 ore, perciò i livelli plasmatici di PCR consentono una migliore valutazione dell'attività infiammatoria

nel tempo. Il polimorfismo del gene *TNF- α* -308G>A incide sulla produzione di *TNF- α* e potrebbe avere effetto sui livelli circolanti di PCR, sebbene in merito a questo, i dati sono ancora incerti. In uno studio *cross-sectional* condotto in Brasile si è valutata l'associazione tra i livelli di PCR e i polimorfismi del gene *TNF- α* -308 G>A: la presenza dell'allele A mutato è risultata significativamente associata con livelli plasmatici di PCR in individui più grandi di 48 anni di età, i quali costituiscono il gruppo a maggior rischio cardiovascolare (Araujo F. et al., 2004).

1.8.3 Influenze dello stile di vita e del genotipo sui livelli di PCR

✓ Il fumo

Il fumo, che è uno dei più importanti fattori di rischio cardiovascolare (Gensini et al., 1998), risulta fortemente associato con le alte concentrazioni di PCR (Bazzano et al., 2003). È stato riscontrato un aumento dei livelli plasmatici di *TNF- α* e di PCR nei fumatori rispetto ai non fumatori (Tappia et al., 1995; de Maat et al., 1996), suggerendo che si ha una maggiore attività infiammatoria in caso di rischio coronarico associato al fumo (Sonmez K. et al., 2002).

✓ Lo stress psicologico

Anche lo stress psicologico è considerato un importante fattore di rischio cardiovascolare; in diversi studi è stato osservato il suo effetto sull'attività infiammatoria valutata mediante la PCR ad alta sensibilità nel plasma e rapportato al polimorfismo *TNF- α* -308 G/A: ne è risultato che i livelli plasmatici di PCR nei soggetti con alto grado di stress erano più alti in quelli con almeno un allele A (AA o AG) rispetto agli omozigoti *wild type* GG. Sembra pertanto che gli omozigoti GG siano più protetti dallo stimolo infiammatorio rispetto ai portatori dell'allele A (Jeanmonod P. et al., 2004).

✓ **L'alcol e l'attività fisica**

Il consumo moderato di alcol e la frequente attività fisica sono stati invece associati con bassi livelli di PCR sia negli uomini che nelle donne; solo in presenza del genotipo mutato AA del polimorfismo *TNF- α* G-308A si è osservato un aumento dei livelli plasmatici di PCR in uomini bianchi e neri e in donne nere, sia allo stato sedentario che dopo 20 settimane di esercizi (Lakka et al., 2006).

1.9 GLI ACIDI GRASSI: DEFINIZIONE ED ASPETTI BIOCHIMICI

Gli acidi grassi presenti in natura si distinguono, in base all'assenza o alla presenza di doppi legami, in saturi e insaturi, rispettivamente. Gli acidi grassi insaturi, a loro volta, si differenziano in monoinsaturi o in poliinsaturi in relazione al numero di doppi legami presenti nella loro molecola (Dei Cas e Nodari. 2003). L'aumento del numero di doppi legami, ovvero il passaggio da acidi grassi saturi a molecole progressivamente più "insature", costituisce un elemento strutturale di primaria importanza funzionale: la presenza in serie di doppi legami conferisce alla catena carboniosa il progressivo incremento dei punti di torsione, proprio in corrispondenza del doppio legame. A livello tridimensionale ciò comporta la crescente tendenza degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) ad assumere una conformazione meno rigida che, sul piano morfo-funzionale, corrisponde ad una crescente fluidità delle membrane entro cui i PUFA sono incorporati. I principali PUFA n-3 sono l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e docosaesaenoico (DHA, C22:6 n-3), l'ultimo dei quali maggiormente rappresentato nel corpo umano; sono contenuti pressoché esclusivamente nel pesce, in particolare in quello grasso come salmone, aringa, sgombro e sardina. I principali PUFA n-6, contenuti principalmente negli oli vegetali e nella carne, sono rappresentati dall'acido γ -linolenico (GLA, C18:3 n-6) e dall'acido arachidonico (AA, C20:4 n-6). La conversione dell'acido linoleico in α -linolenico avviene solamente nei cloroplasti delle foglie, delle alghe e del fitoplancton, mentre negli animali e nell'uomo le due vie metaboliche, pur comprendendo fondamentalmente gli stessi enzimi senza una particolare specificità di substrato, sono distinte e non intercambiabili. Entrambe le serie di PUFA n-6 e n-3 vengono incorporate nelle membrane biologiche, sotto forma di componenti di fosfolipidi e glicolipidi. A tale livello competono per lo stesso sistema enzimatico, in

quanto il loro metabolismo è completamente separato e non è possibile una loro interconversione. Le vie metaboliche della serie linoleica e α -linolenica utilizzano, infatti, gli stessi enzimi per le reazioni di allungamento e desaturazione che dall'acido linoleico e α -linolenico conducono, rispettivamente, alla formazione di acido arachidonico (PUFA PUFA n-6) e di acido eicosapentaenoico (PUFA n-3). L'EPA può ulteriormente essere allungato e desaturato ad acido docosaesaenoico (DHA), che nel corpo umano è il PUFA n-3 più rappresentato; quest'ultimo costituisce una riserva di EPA e può quindi esercitare i suoi effetti cellulari sia direttamente sia indirettamente tramite riconversione in EPA (Dei Cas et al., 2007) (Fig. 6). I grassi n-3 e n-6 sono definiti "essenziali" perché non possono essere prodotti in quantità sufficienti dal nostro corpo: perciò debbono essere forniti dalla nostra dieta come già detto, il nostro organismo è in grado di sintetizzare gli acidi grassi EPA e DHA a partire dall'acido linolenico, ma questo tipo di sintesi è lenta e insufficiente. Per questo è importante assumere questi grassi in forma di elementi preformati, presenti ad esempio nell'olio di pesce.

In diversi interventi di prevenzione si è focalizzata l'attenzione sull'importanza nutrizionale degli acidi grassi n-3 e n-6. Per esempio negli Stati Uniti, *la National Academy of Sciences* sta valutando di inserire questi elementi nutrizionali tra quelli di cui è raccomandata l'assunzione del Fabbisogno Giornaliero Raccomandato (RDA), ed il Canada è tra le nazioni che per prime hanno già compiuto questo passo.

1.9.1 Effetti biologici

Negli ultimi anni sono stati condotti vari studi sia sperimentali su modelli animali sia clinici, che hanno dimostrato i numerosi effetti favorevoli dei PUFA n-3. Il primo effetto biologico individuato è stato quello ipotrigliceridemizzante, per cui tali

farmaci sono stati inizialmente utilizzati per il trattamento delle dislipidemie. Successivamente sono stati evidenziati gli effetti antiaggregante, antiaterotrombotico e, di recente, quello antiaritmogeno. Più recenti sono le acquisizioni circa il ruolo fondamentale svolto dai PUFA n-3 per il normale sviluppo delle funzioni cerebrali. Per tale motivo si è ipotizzato un loro possibile impiego nella prevenzione e nel trattamento dei disturbi cognitivi e mentali. Infatti, le azioni benefiche degli omega 3 sul sistema vascolare si debbono estendere anche a livello cerebrale, dove i disturbi del microcircolo si associano a ridotta capacità cognitiva ed al progredire della demenza, aspetti frequentemente presenti nel paziente anziano. È stato osservato come soggetti affetti da depressione presentino un minor contenuto di PUFA n-3 nelle membrane plasmatiche degli eritrociti e come vi sia una correlazione diretta con la severità della malattia. Pertanto, un aumentato apporto dietetico o farmacologico di PUFA n-3, specie nel paziente anziano che, come è noto, presenta spesso più comorbilità, potrebbe essere indicato per la prevenzione e il trattamento non solo di malattie cardiovascolari ma anche di malattie neurologiche e mentali.

✓ **Effetto antitrombotico ed emoreologico**

Dopo appropriata stimolazione, i PUFA vengono liberati dalle membrane cellulari e, ad opera degli enzimi cicloossigenasi e lipoossigenasi, danno origine a metaboliti attivi, detti eicosanoidi (prostaglandine, trombossani, leucotrieni e altri composti biologicamente attivi). Dall'acido arachidonico derivano il trombossano della serie A2 (TXA₂), i leucotrieni della serie 4 (LTB₄, LTC₄, ecc.) e le prostaglandine della serie 2 (PGI₂, PGD₂, ecc.) formati rispettivamente nelle piastrine, leucociti e cellule endoteliali, mentre l'EPA viene metabolizzato, nelle stesse sedi, a trombossano A3 (TXA₃), leucotrieni della serie 5 (LTB₅, LTC₅, ecc.) e prostaglandine della serie 3

(PGI₃, PGD₃, ecc.). Mentre gli effetti vasodilatanti e antiaggreganti delle prostaglandine della serie 2 e 3 sono considerati equivalenti, il TXA₂ e i leucotrieni della serie 4, derivati dall'acido arachidonico, hanno rispettivamente un effetto proaggregante/vasocostrittore e proinfiammatorio complessivamente superiori agli analoghi eicosanoidi derivati dall'EPA 3. La maggiore assunzione con la dieta di PUFA n-3 determina uno *shift* nella sintesi di eicosanoidi per sostituzione a livello delle membrane cellulari dell'acido arachidonico con EPA, come substrato dello stesso sistema enzimatico. Questo potrebbe in parte spiegare gli effetti biologici favorevoli dei PUFA n-3 rispetto ai PUFA n-6, anche se probabilmente altri meccanismi sono operanti nel determinare un benefico effetto antitrombotico dei PUFA n-3, quali (Haglund et al., 1994):

1. potenziamento della fibrinolisi e riduzione del fibrinogeno;
2. riduzione dell'attività della lipoproteina (a), potente fattore protrombotico oltre che proaterogeno. I meccanismi appena elencati (Tab. 3) rendono ragione dei positivi effetti svolti dagli acidi grassi poliinsaturi n-3 sull'aggregazione piastrinica, con relativo allungamento del tempo di sanguinamento. È stato inoltre dimostrato che una maggiore incorporazione dei PUFA n-3 nella membrana cellulare dei globuli rossi è in grado di incrementarne la fluidità e quindi la deformabilità meccanica ed osmotica, favorendone la circolazione a livello del microcircolo.

✓ **Effetti sull'assetto lipidico**

Gli effetti degli acidi grassi PUFA n-3 a carico dei trigliceridi sono stati quelli maggiormente studiati: si attesta una riduzione media della trigliceridemia attorno al 30% e l'effetto ipotrigliceridemizzante sembra essere dose-dipendente (Weber e Raederstorff, 2000; Mori e Beilin, 2001). Il meccanismo alla base sembra essere una

diminuita sintesi epatica di acidi grassi, trigliceridi, VLDL, oltre che un aumentato catabolismo delle VLDL in LDL, dal momento che le VLDL ricche in omega-3 sarebbero più suscettibili all'azione delle lipoproteinlipasi. Di recente è stata anche ipotizzata un'azione su recettori nucleari PPARs (*Perioxosome Proliferator Activated Receptors*) (Poli A., 2002).

Molto discussi sono invece gli effetti dei PUFA n-3 sugli altri lipidi. Essi incrementano modestamente i livelli di HDL, grazie alla riduzione degli acidi grassi liberi nel plasma, che causerebbe un ridotto trasferimento, mediato dalla *Cholesterol Ester Transfer Protein*, degli esteri di colesterolo dalle HDL alle LDL e VLDL (Rustan et al., 1997). Molto meno certo è l'effetto degli acidi grassi omega-3 sulle concentrazioni plasmatiche delle LDL: è stato descritto un modesto aumento di tale frazione lipoproteica da ascrivere ad una maggiore dimensione delle singole particelle, piuttosto che ad un loro incremento numerico (Suzukawa et al., 1995). Questo è pertanto un effetto antiaterogeno dei PUFA n-3 tenendo conto che solo le LDL piccole e dense sono associate ad un maggior rischio aterogeno. In ultimo, alcuni recenti studi hanno evidenziato che i PUFA n-3 riducono la lipemia post-prandiale, fattore che sembra avere un ruolo indipendente nello sviluppo dell'aterosclerosi: tale effetto sembra essere correlato a una maggiore attività della lipoproteinlipasi sulle lipoproteine, sui chilomicroni e forse anche sulle VLDL (Roche HM e Gibney MJ. 2000; Nordoy et al., 2000).

✓ **Effetti sul metabolismo glucidico**

Tenendo conto del ruolo centrale dell'insulinorestenza nello sviluppo del diabete, alcuni studi hanno voluto verificare se i PUFA n-3 potessero influenzare l'azione dell'insulina a livello dei corrispettivi recettori. Nel ratto è stato evidenziato che

un'aumentata concentrazione di omega-3 migliora la fluidità di membrana e quindi l'interazione tra l'insulina e il suo recettore (Montori et al., 2000). Tutto questo non è stato dimostrato ancora nell'uomo, in cui invece in letteratura sono riportati dati discordanti, anche se dalle ultime metanalisi sembrerebbe che la somministrazione di PUFA n-3 fino a 3 g/die è sicura ed ha effetto neutro sia sull'emoglobina glicata sia sulla glicemia a digiuno.

✓ **Effetti sulla pressione arteriosa e sul tono vascolare**

Gli acidi grassi omega-3 riducono la pressione arteriosa sia in soggetti sani, sia in pazienti affetti da ipertensione arteriosa (Bonaa et al., 1994) attraverso diversi meccanismi:

- soppressione di prostanoidi ad azione vasocostrittrice;
- incrementata produzione e rilascio di nitrossido;
- riduzione della concentrazione plasmatica di noradrenalina;
- regolazione dell'accumulo di calcio nella cellula;
- aumentata fluidità delle membrane plasmatiche.

✓ **Effetti anti-infiammatori**

Dagli acidi grassi omega-3 derivano i leucotrieni della serie 5, che rispetto a quelli della serie 4 (derivati dall'acido arachidonico), sono dotati di un'azione vasocostrittrice e pro-infiammatoria molto più modesta, circa dieci volte inferiore. Ciò può comportare importanti ricadute sia sull'aterosclerosi sia su altre patologie infiammatorie (artrite reumatoide, morbo di Crohn, psoriasi, dermatite atopica) (James e Cleland, 1997; Belluzzi et al., 2000; Majser et al., 2002; Soyland et al., 1994). Il ruolo svolto dall'infiammazione nella genesi della placca aterosclerotica e

nelle condizioni di instabilità e rottura della stessa è ormai universalmente accettato. È quindi verosimile che gli acidi grassi omega-3, mediante l'attenuazione dei processi infiammatori, possano svolgere un ruolo centrale nella prevenzione sia del processo aterosclerotico, sia degli eventi acuti connessi alla rottura della placca (Ross R., 1990).

✓ Effetti antiaterotrombotici

Diversi studi hanno ampiamente dimostrato come la disfunzione endoteliale (De Caterina R., 2000) indotta da diversi fattori quali tossine, *shear stress*, fumo di sigaretta, dislipidemia, sia l'evento iniziale nello sviluppo dell'aterosclerosi: l'endotelio diventa "pro-adesivo", inducendo un'aumentata adesività dei monociti circolanti, che successivamente infiltrano l'intima della parete arteriosa. A questo livello formano la stria lipidica, primo evento morfologicamente rilevabile nell'aterosclerosi, richiamando LDL ossidate dai radicali liberi rilasciati dall'endotelio stesso o dai macrofagi (De Caterina R., 2000). Diversi sono i fattori che mediano l'interazione endotelio-leucociti, quali le chemochine (N-formil peptidi, componenti del complemento, leucotrieni B₄, PAF), le selectine, proteine di adesione (ICAM1, ICAM2, ICAM3, VCAM-1) che riconoscono come ligandi, alcune integrine espresse sulla membrana leucocitaria. Nell'evoluzione da stria lipidica a placca aterosclerotica sono a loro volta implicate numerose citochine, che causano l'infiltrazione di leucociti, cellule muscolari lisce e fibroblasti e promuovono l'adesione piastrinica. Le placche instabili sono quelle particolarmente ricche in lipidi e rivestite da un sottile cappuccio fibroso, che sono a rischio di fissurazione. Esse rappresentano l'ultimo stadio evolutivo dell'ateroma che porta all'angina instabile, all'infarto e a tutte le complicanze correlate ad esso, prima fra tutte

l'insorgenza di aritmie fatali (Falk E. et al., 1995). I PUFA n-3 si dei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi grazie ai loro effetti ipolipemizzanti, antitrombotici, emoreologici e sull'attivazione endoteliale. Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti dei PUFA n-3 sull'attivazione endoteliale come ad esempio una ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL6, TNF α) (Endres e Ghorbani, 1989) di proteina ed mRNA del PDGF- α e - β (Fox e Di Corleto, 1988; Jendraschak et al., 1993) (potente piogeno e chemochina per le cellule muscolari lisce), nonché una ridotta espressione di fattore tissutale dei monociti (Hansen et al., 1989) e di molecole endoteliali di adesione (Shimokawa e Vanhoutte, 1989), ed un aumentato rilascio di nitrossido da parte dell'endotelio. Esperimenti in vitro condotti su colture di cellule endoteliali, hanno dimostrato che l'aggiunta di DHA alcune ore o giorni prima della stimolazione con citochine (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-4 ed LPS), inibisce significativamente l'attivazione endoteliale nelle sue diverse fasi, tra cui l'espressione di molecole di adesione, quali VCAM-1, E-selectina e, in misura minore, ICAM-1 (De Caterina R. et al., 1995). Questo effetto è correlato all'incorporazione dei PUFA n-3 nelle membrane cellulari, mentre è inversamente proporzionale al contenuto di PUFA n-6. Il DHA si concentra maggiormente nel *pool* di fosfatidil-etanolamina, che è notoriamente più rappresentato nella parte interna della membrana plasmatica e pertanto in una posizione strategica per alterare vie di trasduzione intracellulare. Infine i PUFA n-3 inibiscono il fattore di trascrizione nucleare NF-kB che controlla l'espressione coordinata di diverse molecole di adesione e chemotattiche, specifiche per i leucociti (Collins T. et al., 1995).

Un recente *trial* randomizzato ha dimostrato il ruolo degli acidi grassi poliinsaturi n-3 sulla stabilità della placca. In questo studio sono stati arruolati 188 pazienti con

aterosclerosi carotidea condizionante una stenosi critica, in attesa di intervento di tromboendarteriectomia; tali pazienti sono stati randomizzati ad assumere placebo, olio di pesce (PUFA n-3) e olio di semi (PUFA n-6). I pazienti che avevano ricevuto PUFA n-3 presentavano a livello della placca aterosclerotica un'elevata concentrazione di EPA e DHA, una riduzione dell'infiltrazione di monociti e macrofagi, un cappuccio fibroso più spesso sia rispetto ai controlli, sia rispetto ai pazienti trattati con PUFA n-6. Tutti questi fattori contribuiscono sicuramente alla stabilità della placca e potrebbero giustificare quindi la riduzione di eventi cardiovascolari fatali e non fatali osservata negli studi clinici di prevenzione primaria e secondaria con PUFA n-3 (Thies F et al., 2003).

✓ **Effetti antiaritmogeni**

Gli acidi grassi poliinsaturi n-3, nati come farmaci da utilizzare nel controllo delle dislipidemie, hanno imprevedibilmente dimostrato un'efficacia antiaritmica, rappresentando una nuova opzione farmacologica nel trattamento delle aritmie ventricolari, e quindi della Morte Cardiaca Improvvisa (MCI), nei pazienti affetti da cardiopatia post-infartuale. È noto come la MCI rappresenti un'evenienza frequente, potendo esordire come prima manifestazione dell'ischemia acuta nel 25% dei casi o come complicanza tardiva dell'infarto o della cardiopatia ischemica nel 75% dei casi. I meccanismi ipotizzati nell'indurre una maggiore stabilità elettrica di membrana da parte dei PUFA n- 3 sarebbero molteplici. La produzione di eicosanoidi meno dannosi (TXA3 e LTB5) determina una minore risposta vasocostrittrice e infiammatoria tessutale e quindi, una riduzione dell'*infarct size* e una minore produzione di radicali superossido, favorenti l'instabilità elettrica delle aree perinfartuali. I PUFA n-3 sono in grado di modulare la bilancia simpatico-vagale a

favore di quest'ultimo, quando vi sia un'iperattività simpatica (Barron HV e Viskin S., 1998). Infatti, studi condotti mediante l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV), utilizzata come *end-point* surrogato di eventi aritmici e di MCI, hanno documentato come la somministrazione di PUFA n-3 determini un aumento della variabilità R-R sia in pazienti ad elevato rischio aritmico (pazienti infartuati con disfunzione ventricolare sinistra, pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi, pazienti diabetici) (AA.VV, 1996; La Rovere et al., 1998), sia in soggetti sani, e come questo sia correlato con le concentrazioni di EPA e DHA nelle membrane cellulari. L'aumento del contenuto di PUFA n-3 nelle membrane piastriniche è correlato ad un aumento della variabilità della frequenza cardiaca, espressa come SDNN (*Standard Deviation of Normal to Normal intervals*) (Christensen et al., 2001; Christensen et al., 1999; Christensen et al., 2001). Infine, i PUFA n-3 modulano la conduttanza dei canali ionici di membrana, attraverso la modificazione dello stato fisico e, quindi, delle caratteristiche di fluidità del doppio strato lipidico. I PUFA n-3 agiscono a livello dei canali del Na⁺⁺ (Bendahhou et al., 1997) determinando uno spostamento della soglia per l'apertura dei canali verso un valore di potenziale più positivo, in modo tale che solo una stimolazione maggiore del 40-50% possa indurre il potenziale d'azione. A livello dei canali del Ca⁺⁺ (Pepe et al., 1994), i PUFA n-3 determinerebbero un'inibizione delle correnti voltaggio-dipendenti di tipo L, riducendo la concentrazione citosolica di tale ione, che è aritmogena quando eccessiva (ischemia, scompenso, intossicazione digitalica) (Beuckelmann et al., 1992) e, soprattutto, diminuendo le fluttuazioni della concentrazione di Ca⁺⁺ citosolico prima della contrazione, responsabili della comparsa di postpotenziali. Un meccanismo più recentemente ipotizzato circa l'effetto modulante esercitato dai PUFA n-3 a livello dei canali ionici, sarebbe rappresentato da un'alterazione della

tensione che i fosfolipidi di membrana esercitano sul canale stesso, con conseguente cambiamento conformazionale e alterazione della conduttanza ionica (Leaf et al., 2002). Questi effetti sui canali ionici di membrana sono stati testati in una serie di lavori sperimentali condotti prevalentemente su miociti isolati trattati con sostanze aritmogene (ad esempio livelli tossici di calcio o ouabaina) (Kang JX e Leaf A., 1996).

1.9.2 I PUFA n-3 e le dislipidemie

Sono ormai numerosi i *trial* basati sulla dieta mediterranea che hanno dimostrato gli effetti benefici dell'assunzione di pesce sull'assetto lipidico e sul rischio cardiovascolare. In particolare, è stato dimostrato che per ottenere una riduzione della trigliceridemia di almeno il 30% è necessario assumere dai 120 ai 320 grammi al giorno di pesce. Per questo motivo le preparazioni presenti in commercio, che contengono una quantità titolata di PUFA n-3, consentono l'assunzione terapeutica di 3 ai 4 grammi/die, dose ritenuta efficace per una riduzione adeguata della trigliceridemia. Studi condotti in pazienti portatori di differenti fenotipi di ipertrigliceridemia mostrano come i PUFA n-3 abbiano un effetto ipolipemizzante, riducendo i livelli plasmatici di trigliceridi, VLDL, chilomicroni. In una *review* degli studi condotti sull'uomo (Harris WS., 1997) è stato osservato che una dose media di circa 4 g/d riduce di circa il 20-25% i livelli di trigliceridi e che esiste una stretta relazione dose-risposta. Attualmente, l'uso dei PUFA n-3 è indicato nel trattamento delle forme severe di ipertrigliceridemia (Saynor e Gillot., 1992) e nelle forme di dislipidemia mista in associazione alle statine (NCEP., 2001). Un'altra indicazione al loro impiego è la dislipidemia secondaria ad insufficienza renale cronica sia in trattamento conservativo sia dialitico: infatti, in questi pazienti, l'impiego di altri

ipolipemizzanti è limitato dalla presenza di un'alterata funzione renale, mentre i PUFA n-3, efficaci sull'assetto lipidico, non presentano effetti collaterali (Ando et al., 1999).

1.9.3 La carenza di acidi grassi n-3 nella dieta e nella gravidanza

Assumere sufficienti quantitativi di acidi grassi n-3 non è un problema per una persona che viva in un paese sviluppato. Molto diversa è la situazione per quanto riguarda gli n-3: mangiare un quantitativo adeguato di pesce (che è l'alimento più ricco di n-3) si rivela impraticabile per la gran parte delle persone. Mentre i nutrizionisti raccomandano l'assunzione di due o tre pasti a base di pesce ogni settimana, la maggior parte delle persone mangiano pesce una sola volta a settimana. E in effetti ci sono molti studi a supporto di una diffusa carenza di acidi grassi n-3 nell'alimentazione moderna. Si raccomanda di assumere da 800 a 1.100 milligrammi di n-3 al giorno, di cui 3-400 mg di DHA ed EPA, di fatto il consumo medio è limitato ad appena 50 milligrammi di EPA e 80 di DHA, una frazione minima del quantitativo necessario. Mentre il basso tenore di n-3 presenti nella nostra dieta è un fattore che genera preoccupazione, i grandi quantitativi di n-6 che mangiamo quotidianamente contribuiscono a peggiorare la situazione. Un regime alimentare così pieno di carne rossa e di altri cibi ricchi di grassi insaturi si caratterizza anche per dosi di n-6 eccessive rispetto agli n-3. Questo squilibrio potrebbe essere all'origine di infiammazioni e disturbi vari. Poiché gli acidi grassi n-3 sono indispensabili per la crescita, lo sviluppo e il regolare metabolismo umano, dovrebbero far parte della dieta di ognuno (Simopoulos AP., 1991).

Momenti della vita in cui è fondamentale avere un' adeguata assunzione di acidi grassi n-3 sono durante la gravidanza, l'allattamento e l'infanzia, quando gli occhi, il

sistema nervoso e il cervello del bambino si sta sviluppando. Gli acidi grassi n-3 presenti nel latte materno consentono la buona strutturazione e il funzionamento della retina e del sistema nervoso centrale. Ad esempio, in diversi studi è stato osservato che i bambini alimentati con alimenti artificiali privi di acidi grassi n-3 avevano una vista meno acuta di quelli nutriti col latte materno. Nonostante la grande importanza degli acidi grassi n-3, e le raccomandazioni fatte dagli esperti in materia, molti alimenti destinati all'infanzia ne sono ancora privi. Sono molti i nutrizionisti che chiedono l'aggiunta di acidi grassi n-3 almeno nelle preparazioni alimentari destinate ai nati prematuri, che tendono ad avere riserve di n-3 insufficienti (Makrides et al., 1995).

1.9.4 Grassi alimentari: i buoni, i cattivi e gli essenziali

Per stare bene è necessario introdurre con l'alimentazione una certa quantità di grassi, ma è altrettanto opportuno non eccedere. I grassi, oltre a fornire energia in maniera concentrata (9 calorie/g, cioè più del doppio rispetto a proteine e carboidrati), apportano acidi grassi essenziali della famiglia n-6 (acido linoleico) e della famiglia n-3 (acido linolenico) e favoriscono l'assorbimento delle vitamine liposolubili A, D, E, K e dei carotenoidi. Un eccessivo consumo di grassi nell'alimentazione abituale rappresenta invece un fattore di rischio per l'insorgenza di obesità, malattie cardiovascolari e tumori. Le quantità di grassi che assicurano un buono stato di salute variano da persona a persona, a seconda del sesso, dell'età e dello stile di vita: una quantità indicativa per l'adulto è quella che apporta dal 20-25% delle calorie complessive della dieta (per soggetti sedentari) fino a un massimo del 35% (per soggetti con intensa attività fisica). Per i bambini di età inferiore ai 3 anni, invece, la quota di grassi alimentari nella dieta può essere più elevata. Le quantità di grassi

presenti negli alimenti, sia in forma visibile (grasso del prosciutto, della bistecca, ecc.) che invisibile (grasso del formaggio, ecc.), variano da un prodotto all'altro e vanno da valori molto bassi (intorno all'1% in svariati prodotti vegetali e in certe carni e pesci particolarmente magri) fino a valori molto alti nei condimenti: l'85% nel burro e nella margarina e il 100% in tutti gli oli. Tutti i grassi sono uguali sul piano dell'apporto di energia, ma sul piano della qualità possono essere molto diversi. Infatti varia la loro composizione chimica, e in particolare quella in acidi grassi (che possono essere saturi, insaturi). La diversa qualità dei grassi può avere effetti importanti sullo stato di nutrizione e di salute dell'uomo. Secondo le più recenti raccomandazioni, è necessario che nella nostra alimentazione i grassi siano mediamente presenti in modo tale da apportare una quantità compresa tra il 20-25% e il 30-35% della quota calorica giornaliera complessiva. Per quanto riguarda la loro qualità, la ripartizione suggerita è la seguente:

- Acidi grassi saturi non più del 7-10% delle calorie totali;
- Acidi grassi monoinsaturi fino al 20% delle calorie totali;
- Acidi grassi polinsaturi circa il 7% delle calorie totali con un rapporto omega-6/omega-3 intorno a 5:1.

Nei grassi di origine animale, e solo in questi, si trova un altro composto, il colesterolo, presente nel sangue e in tutte le cellule (nelle quali svolge funzioni essenziali per la vita). Il colesterolo contenuto negli alimenti può concorrere a provocare un aumento dei livelli di colesterolo nel sangue. Tale aumento però è molto variabile da persona a persona. Inoltre nel nostro organismo esistono meccanismi di autoregolazione sia per le quantità di colesterolo alimentare che si assorbono, sia per le quantità di colesterolo prodotte nel corpo (più colesterolo mangiamo e meno ne costruiamo). In generale, queste ultime sono notevolmente più

elevate di quelle assunte con la dieta. I grassi alimentari, e soprattutto quelli insaturi, vanno utilizzati preferibilmente a crudo, perché tendono ad alterarsi facilmente per azione del calore e dell'ossigeno dell'aria, dando luogo alla formazione di composti potenzialmente dannosi. È pertanto opportuno scegliere metodi di cottura che non prevedano un eccessivo riscaldamento dei grassi, e comunque evitare le temperature troppo elevate e i tempi di cottura eccessivamente lunghi (INRAN, 2003).

1.9.5 Il *TNF α* e gli acidi grassi nella dieta

L'aumento di acidi grassi saturi e polinsaturi modula l'espressione e/o la secrezione di *TNF- α* dimostrando che l'espressione del *TNF- α* è regolata da questi grassi. Numerosi e controversi sono gli studi condotti, soprattutto su modelli murini, ed è emerso complessivamente che l'aumento di SFA e n-3 FA polinsaturo (PUFA) diminuiscono l'espressione e/o la secrezione del *TNF- α* (Stryjecki C. and Mutch DM, 2011).

I risultati ottenuti dagli studi sui murini sono stati utili per traslarli agli esseri umani: si è potuto osservare che soggetti che consumavano integratori di olio di pesce mostravano una significativa riduzione della produzione di *TNF- α* , tuttavia, i livelli della citochina ritornavano ai valori basali al momento della cessazione degli integratori (Endres et al., 1989). Ciò è stato confermato in un altro studio nel quale i soggetti che assumevano acido α -linolenico (C18: 3 n-3) per 4 settimane avevano una riduzione del 30% nella produzione del *TNF- α* . Quando questi soggetti sono stati ulteriormente integrati con olio di pesce, si è osservato che la sintesi di *TNF- α* veniva inibita fino al 70% (Caughey et al., 1996).

Oltre alle influenze date dal *background* genetico, quindi, anche le quantità di acidi grassi assunti con la dieta determinano variazioni sui livelli di *TNF- α* , offrendo

un'ulteriore spiegazione alla variabilità inter-individuale correlata all'obesità come stato infiammatorio. In uno studio condotto da Grimble et al. (2002) si evidenziò che gli uomini con un allele A nel locus -308 e che erano nel più alto terzile della produzione di *TNF- α* avevano la più alta e significativa riduzione dei livelli di *TNF- α* dopo la supplementazione con olio di pesce rispetto agli uomini omozigoti G/G senza supplementazione. Nessuna conclusione poté essere fatta su individui -308A/A a causa della ridotta dimensione del campione. Tuttavia, un altro studio ha mostrato che i portatori di almeno un allele A con una grande assunzione di *n-6* PUFA mostravano un aumento del rischio di sviluppare obesità. (Nieters et al., 2002). Questi dati sulle interazioni dieta-geni che influenzano la segnalazione di *TNF- α* rappresentano un importante punto da prendere in considerazione in studi futuri sull'obesità come stato infiammatorio correlato con i polimorfismi del *TNF- α* e la dieta (Stryjecki C. and Mutch DM, 2011).

1.10 LA SORVEGLIANZA NUTRIZIONALE

La sorveglianza nutrizionale consiste, secondo la definizione dell'OMS, nel “documentare la presenza e distribuzione in una popolazione di stati morbosi associati o mediati dalla dieta, allo scopo di stabilirne le cause, di individuarne le tendenze nel tempo, nello spazio e negli strati sociali, di predirne le modifiche, di mettere a fuoco le priorità e di consentire un preciso orientamento delle misure correttive e preventive” (Ferro-Luzzi e Leclercq, 1993). La sorveglianza nutrizionale deve essere quindi considerata come un mezzo di promozione della salute in campo nutrizionale.

L'epidemiologia nutrizionale, la valutazione della dieta e l'identificazione delle sue relazioni/associazioni con le cause delle malattie nelle popolazioni umane, include la valutazione del consumo di nutrienti essenziali (es: vitamine, minerali e aminoacidi), fonti di energia (es: proteine, carboidrati, grassi e alcool) e componenti naturalmente presenti negli alimenti (es: fibre vegetali, colesterolo e caffeina) (Keleman LE, 2007).

Per la valutazione dei consumi alimentari che permette di tracciare il profilo dietetico di una popolazione, possono essere utilizzate metodologie diverse che possono essere raggruppate in tre categorie (D'Amicis A, 1999):

- a) Tendenti a valutare la dieta attuale (pesata, diario alimentare, *recall*, ecc.);
- b) Tendenti a valutare la dieta passata (storia dietetica);
- c) Tendenti a valutare la dieta abituale (questionario sulla frequenza alimentare o *Food Frequency Questionnaire*, FFQ).

La scelta tra le diverse metodiche di rilevamento è determinata dagli obiettivi della ricerca stessa, dalle caratteristiche della popolazione e dalle disponibilità economiche, di tempo, di personale e di mezzi.

Ciascun metodo ha i suoi vantaggi e svantaggi e può essere più o meno complesso. Tutte queste metodologie non sono esenti da imprecisioni che possono condurre a *bias* nel valutare la relazione tra esposizione e patologia. E' quindi opportuno che tali tecniche vengano validate al fine di renderle più precise e attendibili.

Gli strumenti che maggiormente si adattano agli scopi della sorveglianza nutrizionale sono il diario alimentare, il *recall* delle 24 ore e la frequenza di consumo.

Generalmente, il diario alimentare per pesata è considerato il metodo migliore per stimare i consumi, ma richiede un considerevole impegno da parte del soggetto e i risultati possono non essere rappresentativi se i soggetti modificano le loro abitudini alimentari durante il periodo dell'indagine (Bingham S, 1987). Il *recall* è un metodo abbastanza semplice, diretto, utilizzabile in soggetti di differenti livelli socio-culturali e consente di stimare in modo affidabile i consumi abituali di gruppi di individui, ma è meno affidabile quando si vogliono valutare i consumi alimentari di singoli individui a causa delle variazioni giornaliere a volte molto ampie (Manuale di sorveglianza nutrizionale, 2003).

Per lo studio di alcune centinaia o migliaia di individui una valida opzione per valutare la dieta a lungo termine è rappresentata dal questionario di frequenza alimentare (*FFQ, Food Frequency Questionnaire*). Il questionario di frequenza alimentare consiste in una lista di alimenti e bevande che rappresentano i maggiori contribuenti ai macronutrienti e il contenuto di micronutrienti della dieta della popolazione in studio. Ogni riga corrisponde ad un singolo alimento (ad es. pane) o ad un gruppo di alimenti che hanno simile composizione chimica (ad es. cracker, grissini, ecc.); queste righe sono raggruppate in categorie di alimenti (ad es. cereali, latte e derivati, frutta, ortaggi, ecc.) (Teufel NI, 1997). Per ogni alimento e bevanda, il soggetto seleziona uno o più opzioni che meglio definiscono la loro frequenza di

consumo nell'ultimo anno facendo riferimento a modelli o porzioni medie (tazze, bicchieri, fetta di pane, ecc.). Le fotografie di differenti misure di portate, illustrate in un atlante fotografico, assistono nel ricordo delle porzioni. I dati raccolti vengono inseriti in un database elettronico costruito utilizzando il *software* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versione 14.0, per mezzo del quale è possibile effettuare le analisi statistiche.

Successivamente la traduzione in energia e nutrienti viene effettuata mediante l'uso di tabelle di composizione degli alimenti (come quelle riportate nel *National Nutrient Database for Standard Reference*) o attraverso l'utilizzo di software specifici (Keleman LE, 2007).

Un *Food Frequency Questionnaire* deve possedere due caratteristiche fondamentali di validità: l'accuratezza e la precisione (o riproducibilità).

L'accuratezza indica il grado di esattezza con la quale il questionario è in grado di misurare l'aspetto della dieta per il quale è stato progettato, cioè la capacità di stimare il corretto consumo del nutriente in studio.

La precisione o riproducibilità si riferisce alla consistenza delle misure rilevate in diverse somministrazioni allo stesso campione e in tempi diversi.

Per validare un FFQ si usano come *standard* di riferimento metodi più accurati in grado di misurare il consumo quali il *recall* delle 24 ore o il diario alimentare. Il *recall* delle 24 ore è solitamente meno accurato del diario alimentare perché tende a sottostimare la variabilità giornaliera. Pertanto, il migliore confronto si ha col diario alimentare, perché gli errori correlati sono ridotti al minimo, in quanto le risposte sono aperte, non si basa sul ricordo e gli alimenti sono pesati. È importante il numero di giorni da inserire nel diario, l'ideale è la validazione con un diario di quattro- sette giorni.

1.10.1 L'USDA *National Nutrient Database for Standard Reference* (SR)

L'USDA (*United States Department of Agriculture*) *National Nutrient Database for Standard Reference* (SR) è la fonte migliore di dati sulla composizione degli alimenti negli Stati Uniti. I dati vengono aggiornati periodicamente con la pubblicazione di versioni nuove. L'ultima versione SR21 è stata pubblicata nel Settembre 2007 e contiene dati su 7412 alimenti e per ognuno di essi sono considerati 140 componenti alimentari.

I dati provengono da fonti pubblicate (letteratura scientifica) e da fonti non pubblicate (che includono dati ottenuti da industrie alimentari e da ricerche condotte da *USDA's Agricultural Research Service* (ARS)). Le analisi di questi dati sono sotto il controllo del *National Food and Nutrient Analysis Program* (NFNAP), in cooperazione con il *National Cancer Institute* ed altri sedici uffici ed istituti *National Institutes of Health* (Pehrsson et al., 2000).

I dati sul contenuto in nutrienti per specifici alimenti o per prodotti alimentari sono ottenuti, per mezzo di analisi di laboratorio, dall'*USDA Nutrient Data Laboratory* (NDL). I valori possono cambiare ed essere riformulati tra una versione SR e l'altra. Non tutti gli alimenti contengono un profilo di nutrienti completo.

Il *database* consiste in una serie di dati: descrizione dell'alimento, nutrienti, peso e misure, note e fonte dei dati. Per ogni alimento viene fornita una descrizione completa.

Il *Nutrient Data file* contiene i valori medi di nutrienti per 100gr di porzione commestibile dell'alimento. Tra i nutrienti che vengono forniti sono presenti: macronutrienti, minerali, componenti lipidici, aminoacidi e vitamine, come gli acidi grassi.

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il Fattore di Necrosi Tumorale alfa (TNF alfa) è una potente citochina pro-infiammatoria che gioca un ruolo fondamentale nella modulazione delle funzioni immunitarie. Già da tempo, è stato dimostrato il ruolo del TNF nel mediare le risposte alle infezioni e nel contribuire alla progressione delle malattie autoimmuni (McDermott MF., 2001). Il gene che codifica per il TNF è altamente inducibile e variazioni genetiche nella regione del promotore possono influenzare la produzione di TNF, in modo da determinare la suscettibilità individuale alle malattie (Wirz et al., 2004). Il gene del *TNF* localizzato nella regione centrale del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC III) è compreso nell'aplotipo ancestrale 8.1, questo sembra influenzare diversi aspetti della risposta immunitaria modificando l'equilibrio delle citochine prodotte (Candore et al., 2001). L'aplotipo 8.1 AH è caratteristico della popolazione caucasica (Tòth et al., 2007). Sulla base di questo razionale, un numero di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nella regione del promotore del gene *TNF* sono stati studiati per valutare i loro effetti sulla trascrizione del gene nonché per la loro possibile associazione con le malattie infiammatorie. In particolare, la sostituzione di una guanina con una adenina in posizione -308 rispetto al sito di inizio della trascrizione del gene *TNF- α* sembra essere associata non solo a numerose malattie infettive ed autoimmuni (per esempio la malaria (McGuire et al., 1994 McGuire et al., 1999; Knight et al 1999), epatite B cronica e C (Hohler et al.,1998), artrite reumatoide (Brinkman et al., 1997), diabete mellito ed altre) ma anche a malattie croniche infiammatorie. Il polimorfismo G-308A del gene *TNF- α* (conosciuto anche come TNF2) influisce sul tasso di trascrizione del gene *TNF- α* , essendo l'allele A responsabile di una trascrizione del gene corrispondente al doppio rispetto a quella data dall'allele *wild type*, con successivo incremento nella

produzione di *TNF- α* (Joffe YT et al., 2010). L'obesità è stata correlata ad un basso livello di attivazione della risposta di fase acuta (Faintuch et al 2008; Cottam et al., 2004), suggerendo che si tratta di una “malattia infiammatoria”. Questo stato infiammatorio sembra essere dovuto alle azioni delle due principali citochine pro-infiammatorie, *TNF- α* e IL-6 (Fruhbeck G., 2008). È stato evidenziato un altro ruolo importante per la variante G-308A nella patogenesi dell'obesità (Brand et al., 2001; Fernandez-Real et al., 1997; Hoffstedt et al., 2000; Walston et al., 1999).

Un altro fattore che potrebbe avere un ruolo nell'obesità è la proteina C-reattiva, una proteina plasmatica di fase acuta, sintetizzata in risposta ad episodi infiammatori all'interno del corpo (Pepys e Hirschfield, 2003; Black et al., 2004). L'analisi dei livelli di PCR può essere utile nel monitoraggio di stati infiammatori e nel determinare il rischio di complicazioni cardiovascolari. Infatti, questo indicatore è considerato come un *marker* di infiammazione acuta ed un modulatore nel sistema immunitario (Tonstad e Cowan, 2009). Molti studi hanno dimostrato un'associazione tra obesità e livelli di PCR; viceversa la perdita di peso comporta una diminuzione delle concentrazioni di PCR (Visser et al, 1999; Timpson et al., 2005).

Inoltre, come sottolineato dalla *World Health Organization* l'obesità è un problema che coinvolge prevalentemente le donne rispetto agli uomini. Le donne sono particolarmente vulnerabili all'aumento di peso in età fertile (Siega-Riz et al., 2004). Inoltre, molti studi hanno analizzato l'importanza del sesso associata alla presenza dell'allele A della variante G-308A in particolare per le donne (Gallicchio et al., 2009) e ne è stato suggerito un ruolo sulla salute riproduttiva (Molvarec et al., 2008). La valutazione dello stato nutrizionale e della dieta rappresentano tasselli importanti per la comprensione delle basi scientifiche di quanto detto. Alcuni studi recenti hanno messo in evidenza come l'assunzione di acidi grassi saturi e polinsaturi

introdotti con la dieta modula l'espressione e/o la produzione di *TNF- α* , in particolare, alcune categorie di acidi grassi hanno una grande influenza sul sistema immunitario e sulle risposte infiammatorie del nostro organismo dimostrando che, l'espressione del *TNF- α* è regolata dagli acidi grassi (Bradley et al., 2008).

In questa tesi sono presentati e discussi i risultati di uno studio epidemiologico di tipo *cross-sectional* condotto nel periodo compreso tra gli anni 2009 - 2011, che ha previsto l'arruolamento delle donne afferenti all'Ambulatorio dell'Unità Operativa di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico-Vittorio Emanuele di Catania.

Lo studio epidemiologico rientra in un progetto più ampio dal titolo: "Sorveglianza nutrizionale per la valutazione dei profili di rischio di una popolazione sana, in età fertile o in gravidanza" coordinato dalla Prof.ssa Antonella Agodi. L'obiettivo generale del progetto era quello di analizzare lo stato nutrizionale di una popolazione di donne in età fertile e di disporre di conoscenze che possano permettere di individuare una più efficace strategia di prevenzione contro le malattie cronico - degenerative.

Considerando tutta la popolazione reclutata nel progetto, gli obiettivi specifici della mia Tesi sono stati quelli di:

- ✓ descrivere le caratteristiche generali della popolazione costituita da donne sane in età fertile;
- ✓ determinare la distribuzione del polimorfismo -308 G>A del gene *TNF α* localizzato nella regione centrale del complesso maggiore di istocompatibilità e verificare che la popolazione segua l'equilibrio di *Hardy-Weinberg* per questo locus.

Tuttavia, il progetto di ricerca a cui ho collaborato, nel corso degli anni ha previsto due fasi di lavoro che hanno portato alla formulazione di obiettivi specifici differenti.

In particolare:

Nella **I fase**, che ha previsto l'arruolamento di un primo gruppo di donne (n= 204), l'obiettivo è stato quello di:

- ✓ valutare le possibili associazioni tra lo stato nutrizionale da un lato e, dall'altro, il profilo lipidico, la concentrazione sierica della proteina C-reattiva e l'età, tenendo conto della presenza di SNP a carico del gene *TNF- α* .

Successivamente, da un'attenta analisi relativa ai dati ottenuti durante la I fase dello studio, è emersa la necessità di valutare la dieta delle donne, ciò è stato ottenuto mediante l'utilizzo di un *Food Frequency Questionnaire* costruito *ad hoc*.

Pertanto, considerando un secondo gruppo di donne (n= 214) gli obiettivi specifici della **II fase** sono stati quelli di:

- ✓ valutare l'assunzione media di acidi grassi mediante il *Food Frequency Questionnaire*;
- ✓ valutare i fattori di rischio genetici e nutrizionali, tenendo conto delle interazioni gene-ambiente.

L'obiettivo a lungo termine del progetto è quello di approfondire le conoscenze sull'interazione tra la dieta, i geni e lo stato nutrizionale, comprendere le misure correttive e preventive da adottare in una più efficace strategia di prevenzione dell'obesità.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Nell'ambito del progetto "Sorveglianza Nutrizionale per la valutazione dei profili di rischio di una popolazione sana, in età fertile o in gravidanza" è stato condotto uno studio di Sorveglianza Nutrizionale, che rappresenta un importante tassello nel percorso strategico della prevenzione. Questo studio, di tipo trasversale, consente di ottenere un'immagine del profilo di rischio di una popolazione di donne in età fertile e/o in gravidanza.

La ricerca è stata condotta presso il Dipartimento GF. Ingrassia, Università degli Studi di Catania. La popolazione in studio è costituita dalle donne in età fertile e/o in gravidanza afferenti presso l'ambulatorio dell'Unità Operativa di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico-Vittorio Emanuele.

Lo studio ha previsto le seguenti fasi:

- i) Rilevamento dei dati antropometrici dello stato nutrizionale: a tutti i soggetti reclutati nell'ambito dello studio sono stati rilevati dati antropometrici; in particolare, la statura ed il peso per il calcolo dell'indice di massa corporea (*Body Mass Index* o BMI), e quindi, la valutazione dello stato nutrizionale.
- ii) Rilevamento dei parametri chimico-clinici ematologici: a tutti i soggetti reclutati è stato effettuato un prelievo ematico nel quale sono stati analizzati, presso l'Ambulatorio dell'Unità Operativa di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico-Vittorio Emanuele, i seguenti parametri ematologici: determinazione dei profili lipidici (HDL, LDL; trigliceridi, colesterolo totale) e la proteina C- reattiva come *marker* infiammatorio.

iii) Determinazione dell'intake di acidi grassi assunti con la dieta: è stato somministrato un questionario sulle frequenze alimentari (*Food Frequency Questionnaire*, FFQ) appositamente predisposto per rilevare l'intake di acidi grassi saturi ed insaturi assunti col consumo di alimenti.

iv) Analisi del polimorfismo genetico: dal campione di sangue (0,2ml), prelevato alle donne partecipanti al progetto, è stata eseguita l'estrazione del DNA e la determinazione del polimorfismo genetico -308G>A del gene *TNF- α* . mediante PCR-RFLP.

3.2 Reclutamento delle pazienti

Nel periodo compreso tra gli anni 2009 - 2011 è stata proposta la partecipazione allo studio a tutte le donne che afferivano presso il laboratorio di analisi dell'Unità Operativa Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Vittorio Emanuele, Ferrarotto e Santo Bambino.

Alle donne invitate a partecipare al progetto, dopo una dettagliata spiegazione degli obiettivi dello studio, è stato fatto firmare il consenso informato atto a dare la loro disponibilità a utilizzare i dati rilevati al fine della ricerca. Per le partecipanti ancora minorenni, ma che rientrano nella categoria di donne in età fertile il consenso informato è stato fatto firmare a uno dei genitori o al tutore legalmente designato.

Per ogni donna reclutata, sono stati raccolti dati anagrafici; antropometrici (peso e altezza); socioeconomici; stato fisiologico e abitudini comportamentali; dati sulla frequenza di consumo di determinati alimenti.

Presso il laboratorio di analisi, per ogni paziente è stato prelevato un campione di sangue necessario per le analisi ematologiche e per la determinazione del polimorfismo del gene *TNF- α* , che è stata eseguita presso i laboratori di

epidemiologia molecolare del Dipartimento GF. Ingrassia dell'Università degli Studi di Catania.

3.3 Strumenti di Sorveglianza Nutrizionale

Per condurre il Progetto è stato coinvolto un gruppo di *esperti* del Dipartimento GF. Ingrassia (biologi-igienisti) che hanno svolto il ruolo di consulenti scientifici, soprattutto in riferimento agli aspetti metodologici della sorveglianza, e hanno collaborato per la realizzazione di strumenti informativi necessari per l'attuazione del Progetto.

Strumenti utilizzati, per la raccolta dei dati primari, sono stati:

- per la raccolta dei dati antropometrici: bilancia pesa persona elettronica, stadiometro portatile;
- per la raccolta dei dati anagrafici e socio-economici, e delle abitudini comportamentali: questionario;
- per la raccolta di dati sui consumi alimentari: *Food Frequency Questionnaire*.

3.4 Rilevazione dei dati: anagrafici, antropometrici, socio-economici e riguardanti la dieta

Per la raccolta di dati primari è stato predisposto appositamente un questionario (*Allegato A*). La progettazione dei questionari si è avvalsa di modelli di questionari per la sorveglianza nutrizionale pubblicati e validati dall'INRAN (Manuale INRAN di Sorveglianza nutrizionale, 2003) e modificati secondo gli obiettivi specifici di questa ricerca.

Ad ogni partecipante allo studio sono stati assegnati due codici: un numero identificativo progressivo (assegnato dai rilevatori) ed un numero identificativo

richiesta (assegnato dall'Azienda Ospedaliera) che è stato indicato nella prima pagina del questionario sotto la voce, rispettivamente, "ID progressivo" ed "ID richiesta". Questi codici hanno permesso l'identificazione della partecipante senza dover ricorrere al nome, nel rispetto della legge sulla *privacy* (675/96).

Il questionario è stato compilato individualmente da ogni partecipante sotto la guida e l'aiuto di un rilevatore opportunamente formato.

Le categorie dei dati raccolti con il questionario possono essere schematizzati come segue:

- Dati anagrafici: data di nascita e provenienza geografica;
- Dati antropometrici: peso e altezza. Per le donne in gravidanza è stato chiesto il peso pre-gestazionale e rilevato il peso attuale.
- Dati socioeconomici: titolo di studio conseguito e condizione lavorativa della partecipante e dell'eventuale *partner*;
- Stato fisiologico e abitudini comportamentali: abitudine al fumo, stato di gravidanza, ed eventualmente la settimana di gestazione, l'uso di integratori alimentari specifici per il periodo periconcezionale ed di integratori di acido folico, multiminerali e multivitaminici durante la gravidanza e non. Ulteriori dati includono informazioni su possibili intolleranze alimentari, sull'abitudine e la bravura a cucinare.
- Dati sulla frequenza di consumo degli alimenti come: cereali, pane, pasta, snack, carne rossa e bianca, pesce, uova, latticini, vegetali, frutta, dolci, bevande, condimenti e salse) dai quali è stato possibile successivamente ricavare l'*intake* di acidi grassi saturi ed insaturi.

3.4.1 Valutazione dello stato nutrizionale: Indice di Massa Corporea

L'Indice di Massa Corporea (*Body mass index*, BMI), o indice di Quetelet, è stato calcolato dividendo il peso espresso in kg per il quadrato della statura espressa in metri (kg/m^2). Questo è l'indice ponderale più utilizzato come espressione del peso "aggiustato" per la statura e come indice di adiposità, in quanto è quello maggiormente correlato con il grasso corporeo e, allo stesso tempo, quello meno correlato con la statura. Per la valutazione dello stato nutrizionale è stato utilizzato il peso corporeo rilevato al momento del reclutamento per le donne non in gravidanza e il peso corporeo prima della gravidanza per le donne in stato gestazionale. Per la definizione dello stato nutrizionale è stata utilizzata la classificazione dell'WHO (WHO, 1995) che riporta le seguenti categorie: sottopeso $< 18,5 \text{ Kg}/\text{m}^2$; - normopeso $18,5 - 24,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$; - sovrappeso $25,0 - 29,9 \text{ Kg}/\text{m}^2$; - obeso $>30,0 \text{ Kg}/\text{m}^2$ (Tal. 4).

3.5 Il *Food Frequency Questionnaire*

Per valutare i consumi alimentari nella dieta attuale della popolazione in studio è stato predisposto appositamente per questo studio un *Food Frequency Questionnaire* (FFQ) (*Allegato B*). L' FFQ è stato progettato adattando due modelli già utilizzati e validati, in particolare, quello proposto dal *Nutrition Assessment Shared Resource* (NASR) *Fred Hutchinson Cancer Research Center*, (FHCRC) (Neuhouser et al., 2003), quello adottato dal Centro di Riferimento Oncologico di Aviano, dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche "M. Negri" di Milano e quello adottato dall'*International Agency for Research on Cancer*, Lyon, Francia (Polesel et al., 2007).

Il questionario di frequenza alimentare consiste in una lista degli alimenti che presentano il maggior contenuto di acidi grassi. Gli alimenti selezionati sono stati

raggruppati in categorie di alimenti, in particolare: i) cereali, pane, *snacks*; ii) carne rossa, pollo, pesce, uova; iii) pasta, piatti misti, zuppa; iv) prodotti caseari; v) vegetali e cereali; vi) frutta; vii) dolci; viii) bevande; vix) condimenti e salse.

Per ogni alimento e bevanda, il soggetto doveva indicare l'opzione che meglio definiva la loro frequenza di consumo nell'ultimo mese e la porzione abitualmente consumata, facendo riferimento a modelli o porzioni medie (tazze, bicchieri, fetta di pane, ecc.). Per evitare eventuali *bias* di rilevazione durante la compilazione dell'FFQ veniva fornito al soggetto reclutato un atlante fotografico illustrante le differenti porzioni e misure casalinghe, in questo modo si è potuta ottenere una uniformità nella rilevazione dei consumi.

3.5.1 Valutazione dell' assunzione di acidi grassi

La traduzione in energia e nutrienti dei consumi, rilevati tramite l' FFQ, è stata effettuata tramite l'uso di tabelle di composizione degli alimenti ricavate dal *software* USDA *National Nutrient Database for Standard Reference*. L'uso del *database* per la traduzione in principi nutritivi è stata determinante agli effetti della validità dei risultati.

Per ogni alimento e bevanda, presente nel FFQ, sono stati calcolati i valori di acidi grassi presenti nel singolo alimento espressi in grammi, facendo riferimento alla porzione normale e alle caratteristiche proprie dell'alimento (crudo o cotto, fresco o surgelato). I valori ottenuti dalla ricerca nel *database* sono stati riportati in un foglio di calcolo *Excel* contenete tutti gli alimenti presenti nel FFQ, opportunamente costruito, che ha permesso la valutazione dell'assunzione mensile e media quotidiana di acidi grassi con gli alimenti consumati, per ogni donna reclutata.

3.6 Estrazione del DNA da campioni di sangue

L'estrazione del DNA da sangue intero è stata eseguita utilizzando l'*illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Tale *kit* consente di ottenere in tempi brevi estratti di DNA ad elevato grado di purezza da piccoli volumi di sangue (50-300 μ l) e permette di allontanare sostanze inibenti che possano interferire con le reazioni di amplificazione. Il *kit* fornisce le seguenti soluzioni: *Proteinase K*, *Wash Buffer*, *Lysis Solution* ed *Elution Buffer*. Il protocollo utilizzato per l'estrazione e la purificazione del DNA è stato eseguito seguendo le indicazioni fornite dal produttore, ed è diviso in quattro fasi: lisi delle cellule del sangue; assemblaggio e caricamento nelle colonnine; lavaggi; eluizione.

- Lisi delle cellule del sangue: Per l'estrazione del DNA sono necessari 200 μ l di sangue intero in EDTA a cui vengono aggiunti 20 μ l di proteinasi K e 400 μ l *Lysis Solution* in una *epENDORF* da 1,5ml; si vortexa per 15sec e si mette ad incubare a temperatura ambiente per 10min. Alla fine di questo *step* il colore del campione vira da rosso a marrone scuro.

- Assemblaggio e caricamento delle colonnine: Il processo di purificazione, per l'estrazione del DNA, è effettuato su una colonnina utilizzando un sale caotropico. In questo modo il DNA si adsorbe in modo selettivo ai filtri in silice della membrana contenuta in ciascuna colonnina, così da separarlo dalle altre componenti cellulari che invece non si legano alla silice. La separazione viene eseguita sfruttando il principio della centrifugazione. Nelle colonnine, fornite dal *kit*, si dispensano 620 μ l di campione lisato e si centrifuga per 1 minuto a 11.000g.

- Lavaggi: Eliminare il precipitato accumulato nella parte inferiore della colonnina, aggiungere 500 μ l di *Lysis Solution* nelle colonnine, centrifugare per 1 minuto a 11.000g e rimuovere il precipitato; il secondo lavaggio è eseguito aggiungendo 500 μ l

di *Wash Buffer* nelle colonnine, si centrifuga il tutto per 3 minuti a 11.000g e alla fine si elimina il tubo contenente il precipitato.

- Eluizione: Il DNA legato alla membrana della colonnina viene eluito in una nuova *eppendorf* da 1,5ml. Si aggiungono 200 μ l di *Elution Buffer* (preriscaldato a 70°C) e si lascia incubare per 1 minuto a temperatura ambiente. Dopo, si centrifuga per 1 minuto a 11.000g, in modo da raccogliere tutto il DNA estratto nella *eppendorf*.

Il DNA estratto è stato conservato a -20°C.

3.7 Misura della concentrazione e della purezza del DNA allo spettrofotometro

La concentrazione del DNA di ogni campione estratto è stata analizzata allo spettrofotometro *Quantum Gene Pro* misurando l'assorbanza a 260 nm.

Per la verifica della purezza del DNA estratto si analizza sia il rapporto delle assorbanze a 260 nm e 280 nm ($A_{260/280}$) che dà indicazioni sulla presenza di proteine contaminanti (le proteine assorbono a 280 nm), sia il rapporto delle assorbanze a 260 nm e 230 nm ($A_{260/230}$) che dà indicazioni sulla presenza di sostanze quali carboidrati, fenoli, peptici e composti aromatici. Un campione di DNA puro dovrebbe avere un rapporto ($A_{260/280}$) di circa 1,8 ed un rapporto ($A_{260/230}$) intorno a 2,2.

Dopo la lettura, ogni campione di DNA è stato diluito con acqua bidistillata sterile in modo da ottenere una massa di DNA di 4ng/ μ l.

3.8 Determinazione dei polimorfismi genetici

Dopo l'estrazione del DNA è stata effettuata la determinazione dei polimorfismi mediante la tecnica basata sulla *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP).

La sequenza di *primer* utilizzata è stata la seguente:

forward: 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3'

reverse: 5' GGG ACA CAC AAG CAT CAA G 3'

Per ogni reazione di PCR sono stati utilizzati:

- pureTaq Ready-To-Go PCR Beads
- 1,0 μ l *Forward primer* (10 pmol)
- 1,0 μ l *Reverse primer* (10 pmol)
- 20 μ l H₂O
- 3,0 μ l gDNA (20 ng/ μ l concentrazione).

Per il controllo negativo:

- 1,0 μ l *Forward primer* (10 pmol)
- 1,0 μ l *Reverse primer* (10 pmol)
- 23 μ l H₂O

Le condizioni di reazione sono state le seguenti:

1. Denaturazione iniziale: 3 minuti a 95°C
2. Denaturazione: 1 minuto a 95°C
3. *Annealing*: 1 minuto a 58°C
4. Estensione: 1 minuto e 30 secondi a 72°C

I passaggi 2, 3, e 4 sono stati ripetuti per 40 cicli.

Dopo l'amplificazione del campione è stato utilizzato l'enzima *NcoI* (Fermantas, Vilnius, Lithuania) per la digestione enzimatica (37°C per 16 ore), in particolare per ogni amplificato è stata aggiunta la seguente mix di reazione:

- 2,0 μ l *Buffer* di restrizione
- 2,0 μ l H₂O
- 2,0 μ l enzima di restrizione

In seguito alla restrizione enzimatica, i frammenti digeriti sono stati separati mediante corsa elettroforetica utilizzando gel *NuSieve* al 5% (LONZA, *NuSieve* 3:1 *agarose*), successivamente visualizzati con il *GeneScan Analysis Software* (*PE Biosystem*) ed interpretati.

In particolare, per gli individui omozigoti *wild type* (GG), i frammenti erano lunghi 87+(20) paia di basi, per gli omozigoti mutati (AA), 107 paia di basi e per gli eterozigoti (GA), 107 + 87 + (20) paia di basi (Figura 7).

3.9 Analisi dell'equilibrio di *Hardy-Weinberg*

Per verificare se la popolazione in studio è in equilibrio di *Hardy-Weinberg*, per ognuno dei tratti genetici studiati, è stato effettuato il test del chi-quadrato e il G-test (anche chiamato "*likelihood ratio test*"), che confrontano i genotipi osservati e quelli attesi.

Inoltre, è stata analizzata la diversità allelica, che fornisce una stima obiettiva della frequenza di eterozigoti attesi (h), e un errore *standard* per h. Se il campione della popolazione segue l'equilibrio di *Hardy-Weinberg*, allora h dovrebbe essere equivalente alla frequenza degli eterozigoti osservati.

Inoltre, la deviazione dalle proporzioni *Hardy-Weinberg* è stata misurata mediante l'indice di fissazione di *Wright* (F); quando i valori di F si avvicinano all'unità se sono

positivi riflettono un eccesso di omozigoti mentre se sono negativi riflettono un eccesso di eterozigoti. Tutti i test sono stati eseguiti con il programma GENEPOP, versione 1.31.

3.10 Analisi statistica dei dati

Presupposto basilare per l'elaborazione dei dati è il loro trasferimento su un supporto informatico. Questa attività richiede che i dati, opportunamente codificati, siano inseriti in fogli elettronici o *database*. L'elaborazione successiva risulterà estremamente semplificata se tale inserimento avviene in modo controllato, ossia predisponendo un programma di *data entry* corredato di istruzioni e preferibilmente contenente procedure di controllo automatico. In particolare, questo assicura la standardizzazione della codifica delle informazioni specialmente nel caso in cui l'inserimento sia effettuato in luoghi e tempi diversi, come è avvenuto nel presente progetto.

I dati raccolti sono stati inseriti in un database elettronico costruito utilizzando il *software* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versione 14.0. Le analisi statistiche sono state effettuate con lo stesso *software*.

Le analisi dei dati costituiscono il mezzo attraverso cui i dati grezzi (matrice dei dati) forniscono risultati sintetici che descrivono il fenomeno in esame e che consentono l'identificazione e/o la costruzione di indicatori. Le analisi sono state realizzate a diversi livelli. Il primo di essi, il cosiddetto *cleaning* dei dati, è l'analisi effettuata sui dati registrati nel *database* per verificarne completezza (tutte le variabili sono registrate) e congruenza (i valori sono coerenti).

Il secondo livello di analisi è quello esplorativo semplice (analisi monovariata, descrittiva) e analitico (analisi bivariata, basato su più variabili), con l'identificazione

di connessioni tra i diversi caratteri. L'analisi bivariata è l'indagine delle relazioni tra due o più variabili, per appurare la presenza di associazioni, come l'interdipendenza tra due variabili o la loro indipendenza. La significatività delle associazioni è stata valutata mediante il test χ^2 , quella delle differenze tra medie mediante il T *Student*. Per valutare la correlazione esistente tra variabili quantitative, è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson e/o di Spearman.

L'uso di una tecnica piuttosto che un'altra o la scelta del *set* di variabili è dipesa dai fattori che sono stati evidenziati come più importanti.

4. RISULTATI

ANALISI DESCRITTIVA SU TUTTA LA POPOLAZIONE RECLUTATA NEGLI ANNI 2009-2011

4.4 Popolazione in studio

Nel periodo compreso tra l'anno 2009 e 2011 presso l'Ambulatorio dell'Unità Operativa di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico-Vittorio Emanuele di Catania, sono state reclutate 418 donne in età fertile o in gravidanza. Ciascuna di esse, al momento dell'arruolamento nello studio, ha firmato un consenso informato dando quindi la propria disponibilità a utilizzare i dati rilevati al fine della ricerca.

L'età media della popolazione partecipante al progetto è risultata pari a 28.21 anni (mediana 27 anni; *range*: 14 - 52 anni).

Riguardo la **provenienza geografica** il 95.9% è nato in Italia ed il 4.1% in Paesi esteri, considerando l'etnia, è emerso che il 98.1% (n= 409) apparteneva alla razza caucasica e l'1.9% (n= 8) ad altre razze.

È stata analizzata la **condizione socio-economica**, si è osservato che la maggior parte delle donne casalinghe (75.2%) aveva un livello di istruzione medio-basso (cioè senza nessun titolo o con licenza elementare o con licenza media) invece la maggior parte delle non casalinghe (65.5%) aveva un livello di istruzione medio-alto (cioè con diploma o con laurea) ($p < 0.001$) (Tabella 5). Complessivamente il 73.1% delle reclutate era economicamente inattiva

Il 57.1% (n= 237) delle donne era in stato di gravidanza con un'età media di 26.8 anni (mediana 26 anni, *range*: 14 - 52 anni).

4.1.1 Abitudine al fumo di sigaretta

Il 28% delle donne arruolate ha dichiarato di essere fumatrice, il 14.2% di essere una ex fumatrice e il 57.8% di non aver mai avuto questa abitudine (Tabella 6). Analizzando l'abitudine al fumo di sigaretta e lo stato di gravidanza è emerso che, tra le fumatrici il 48.3% (n= 56) era in gravidanza mentre il 51.7% (n= 60) non lo era. Tra le non fumatrici o ex fumatrici, il 60.5% (n= 181) era in gravidanza mentre il 39.5% (n= 118) non lo era. Tali differenze sono risultate statisticamente significative ($p= 0.024$) (Tabella 7).

Considerando la condizione socio-economica è emerso che il 32.9% delle casalinghe e il 20.4% delle non casalinghe erano fumatrici ($p= 0.005$). Inoltre, il 33.5% delle fumatrici aveva un livello di istruzione medio-basso contro il 20.5% che aveva un livello di istruzione medio-alto ($p= 0.004$) (Tabella 8, 9).

4.2 Valutazione dello stato nutrizionale: Indice di Massa Corporea

La rilevazione del peso e dell'altezza delle 418 donne in studio è stata utilizzata per il calcolo del BMI e la definizione dello stato nutrizionale. Utilizzando la classificazione dell' WHO (WHO, 1995) per la definizione dello stato nutrizionale è emerso che: il 10.1% delle donne era in sottopeso; il 55.7% normopeso; il 19.4% in sovrappeso ed il 14.8% era in uno stato di obesità. Pertanto, il 34.2% della popolazione in studio era in sovrappeso o obesa. Per quanto riguarda le donne in gravidanza, è stato considerato in peso pregestazionale (Tabella 10).

4.2.1 Associazione tra stato nutrizionale ed età

Considerando lo stato nutrizionale delle donne suddivise per fasce d'età in base alla distribuzione in percentili, si è osservato che tra le donne sottopeso-normopeso il

33.5% apparteneva alla fascia più giovane, il 23.3% rientrava nella fascia compresa fra i 24-27 anni, il 22.9% tra i 28-32 anni ed infine il 20.4% nella fascia di età più anziana.

Invece, analizzando le donne sovrappeso o obese, il 21% apparteneva alla fascia più giovane, il 16.8% rientrava nella fascia compresa fra i 24-27 anni, il 28.7% tra i 28-32 anni ed infine il 33.6 % nella fascia di età più anziana. Ciò evidenzia che la maggior parte delle donne sottopeso o normopeso rientravano nella fascia di età più giovane, mentre le donne sovrappeso o obese in quelle più anziane (Tabella 11). Queste differenze sono risultate statisticamente significative ($p < 0.001$), tale risultato è stato confermato anche dal confronto delle medie dell'età delle donne in base allo stato nutrizionale (Tabella 12).

Inoltre, si è osservato che la maggior parte delle donne sottopeso o normopeso (56.7%, $n = 156$) aveva un'età inferiore o uguale a 27 anni (valore mediano) invece, tra le donne sovrappeso o obese la maggior parte (62.2%, $n = 89$) aveva un'età superiore ai 27 anni. Tali differenze sono risultate altamente significative ($p < 0.001$) (Tabella 13). È stato anche osservato che esiste una correlazione positiva tra il BMI e l'età ($r_p = 0.143$, $p < 0.01$).

4.2.2 Associazione tra stato nutrizionale ed etnia

E' stata altresì effettuata l'analisi bivariata tra lo stato nutrizionale e l'etnia, ed è emerso che tra le donne sottopeso o normopeso il 98.2% erano caucasiche ed il restante 1.8% non lo erano. Considerando le donne sovrappeso o obese la maggior parte (97.9%) erano di origine caucasica mentre la restante parte non lo erano. Tali differenze non sono risultate statisticamente significative (Tabella 14).

4.2.3 Associazione tra stato nutrizionale e condizione socio-economica

Analizzando l'associazione tra lo stato nutrizionale e il livello socio-economico è emerso che la maggior parte delle donne sovrappeso o obese possedeva un livello di istruzione medio-basso (66.9%) rispetto alle sottopeso o normopeso (54.4%) ($p = 0.014$). Tra le donne in sovrappeso o obese il 68.5% era casalinga, contro il 54.9% delle sottopeso o normopeso. Tali differenze sono risultate statisticamente significative ($p = 0.007$) (Tabella 15).

4.3 Distribuzione dei genotipi del polimorfismo *TNF- α* -308 G>A

Tutte le donne arruolate durante lo studio sono state sottoposte ad analisi per la determinazione del polimorfismo genetico *TNF- α* -308 G>A. Dall'analisi della distribuzione del polimorfismo è emerso che: il genotipo più frequente è risultato quello omozigote *wild type* GG (72.5%, $n = 303$), seguito dall'eterozigote AG (26.1%, $n = 109$) e dall'omozigote mutato AA (1.4%, $n = 6$) (Tabella 16). Nella popolazione in studio l'allele G è risultato il più frequente (85.5%) rispetto all'allele A (14.5%).

Le analisi del Chi quadrato e del test G dimostrano che la popolazione in studio risulta in equilibrio di *Hardy-Weinberg* per il locus in studio. Nella Tabella 17 sono indicati i valori del Chi quadrato e del test G, nonché le probabilità associate, per il locus in studio ($p > 0.05$). L'equilibrio è stato confermato anche dall'eterozigosità attesa ($h: 0.25$) che è risultata comparabile con quella osservata ($h: 0.26$) per il locus in studio. Inoltre, la deviazione dalle proporzioni di *Hardy-Weinberg* è stata misurata dall'indice di fissazione F, inteso come una misura di eccesso o di mancanza di eterozigoti ($F: -0.052$).

4.3.1 Interazione gene-ambiente: polimorfismo -308 G>A del gene *TNF- α* ed età

Al fine di verificare l'associazione tra i genotipi del polimorfismo genetico *TNF- α* -308 G>A e l'età, le donne sono state raggruppate in base ai percentili d'età e i genotipi sono stati confrontati nei diversi gruppi. Dall'analisi è emerso che nelle fasce d'età 24-27 anni e 28-32 anni non erano presenti omozigoti mutati (AA), al contrario, tutte le altre fasce d'età presentano donne con genotipo AA e in particolare quella più avanzata (33- 52 anni) (Tabella 18). Analizzando la frequenza del genotipo AA o AG nelle diverse fasce d'età si è osservato che nella prima fascia di età (fino a 23 anni) il 27.9% (n= 34) delle donne era AA o AG, nella seconda fascia (24-27 anni) il 31.8% (n= 28), tra i 28-32 anni il 24% (n= 25) e tra i 33-52 anni il 26.9% (n= 28). Considerando la frequenza del genotipo GG nelle diverse fasce d'età è emerso che nella fascia d'età più giovane il 72.1% (n= 88) delle donne era GG, nella fascia 24-27 anni il 68.2% (n= 60), in quella compresa tra 28-32 anni il 76% (n= 79) e nella fascia d'età più anziana il 73.1% (n= 76) (Tabella 19).

Successivamente, è stata analizzata la frequenza del genotipo AA o AG e del genotipo GG considerando due fasce d'età per volta, tali risultati sono mostrati nelle tabelle (20, 21, 22, 23, 24, 25). Nessuna delle differenze è risultata statisticamente significativa.

4.3.2 Polimorfismo -308 G>A del gene *TNF- α* e stato nutrizionale

Dall'analisi bivariata effettuata per verificare l'associazione tra i genotipi del polimorfismo in studio e lo stato nutrizionale (classificato in donne sottopeso/normopeso e donne sovrappeso/obese) è emerso che tra le donne con genotipo AA o AG erano con maggiore frequenza sovrappeso o obese (38.3%)

rispetto alle donne con genotipo GG (32.7%), tali differenze non sono risultate statisticamente significative. Confrontando le donne obese rispetto alle non obese (sottopeso, normopeso e sovrappeso), si è osservato che le donne con genotipo AA o AG erano con maggiore frequenza obese (20%) rispetto alle donne con genotipo GG (12.9%), sebbene tali differenze non siano risultate statisticamente significative (Tabella 26a, 26b).

Stratificando la popolazione in base allo stato gestazionale, considerando solo le donne non in gravidanza (n= 181) e classificando le donne in obese e non obese, si è osservato che tra le obese il 25% erano con genotipo AA o AG rispetto alle donne non obese, di cui la maggior parte (89.6%) erano con genotipo *wild type* GG. Tali differenze sono risultate statisticamente significative ($p= 0.011$; OR= 2.87, IC95% = 1.25 - 6.61) (Tabella 27). Successivamente sono state confrontate le medie dei valori di BMI tra le donne che presentavano o meno l'allele mutato, ed è emerso che la media dei valori di BMI sono più alti nelle donne con genotipo AA o AG rispetto alle donne con genotipo GG (Tabella 28), tale risultato si ottiene anche considerando solo le donne non in gravidanza (Tabella 29), nonostante ciò, le differenze non sono statisticamente significative.

4.3.3 Polimorfismo -308 G>A del gene *TNF- α* ed etnia

Considerando l'etnia, le donne sono state suddivise in due categorie: quelle appartenenti alla razza caucasica e quelle che non vi appartenevano. Incrociando con il polimorfismo, si è potuto osservare che il genotipo mutato AA era presente esclusivamente nella razza caucasica. Inoltre, il genotipo AA o AG era presente nel 27.6% e nel 25% della popolazione caucasica e non caucasica rispettivamente.

Considerando il genotipo GG, era presente nel 72.4% nelle donne caucasiche e nel 75% nelle non caucasiche (Tabella 30 a, b).

Dall'analisi bivariata è emerso che non c'è associazione tra la presenza dell'allele mutato A e l'etnia, questo può essere spiegato dall'elevata numerosità delle donne caucasiche rispetto alle non caucasiche.

I FASE DELLO STUDIO:

4.4 Descrizione del profilo lipidico

Durante la prima fase dello studio sono stati raccolti i risultati delle analisi del profilo lipidico delle 204 donne arruolate. In particolare, sono stati considerati i valori di colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi, colesterolo totale e rapporto fra colesterolo totale e colesterolo HDL.

Considerando la popolazione di questa I fase, è stato osservato che la media del valore di colesterolo HDL era di 61.9 mg/dL e deviazione standard ± 15.7 ; la media del colesterolo LDL di 116.4 mg/dL e deviazione standard ± 42.19 ; la media dei trigliceridi di 130 mg/dL e deviazione standard ± 75.9 ; la media del colesterolo totale di 204 mg/dL e deviazione standard ± 54.5 ; la media del rapporto fra colesterolo totale e colesterolo HDL di 3.43 e deviazione standard ± 1.12 . La tabella 31 riporta i risultati sopra descritti per ciascuno dei parametri analizzati.

Confrontando le medie dei valori del profilo lipidico nelle donne distinte per stato gestazionale è emerso che le donne in gravidanza presentavano medie dei valori di colesterolo HDL, LDL, colesterolo totale e trigliceridi più elevate rispetto alle donne non in gravidanza. Tali differenze sono risultate tutte statisticamente significative (tabella 32).

4.5 Analisi del profilo lipidico, stato nutrizionale e genotipi: interazione genotipo nutrizionale e profili di rischio cardiovascolare

E' stato altresì analizzato il profilo lipidico nelle donne in studio sulla base del loro stato nutrizionale. Successivamente, è stata calcolata la media e la deviazione standard di ciascun parametro del profilo lipidico considerando le donne distinte per stato nutrizionale e genotipo e in seguito, per stato di gravidanza e genotipo.

Considerando le 204 donne è emerso che, nelle sovrappeso o obese la media del valore di colesterolo HDL era di 58.1 mg/dL e la deviazione standard di ± 16.3 ; mentre lo stesso parametro nelle donne sottopeso o normopeso era di 64 mg/dL e deviazione standard di ± 15 . Per quanto riguarda la media del colesterolo LDL questa, per le donne con stato nutrizionale sovrappeso o obeso, era di 122.2 mg/dL e deviazione standard di ± 46.2 ; mentre per le donne sottopeso o normopeso la media era di 113.2 mg/dL e deviazione standard di ± 39.6 . La media dei valori di trigliceridi era 136.8 mg/dL e deviazione standard ± 74.9 nelle donne sovrappeso o obese, mentre nelle donne normopeso o sottopeso la media era di 126.3 mg/dL e deviazione standard ± 76.7 . Il colesterolo totale aveva una media di 206.9 mg/dL e deviazione standard ± 58.9 nelle donne sovrappeso o obese, mentre nelle donne sottopeso o normopeso aveva una media di 202.5 mg/dL e deviazione standard ± 52 . Il rapporto fra colesterolo totale e colesterolo HDL per le donne sovrappeso o obeso presentava una media di 3.73 e deviazione standard ± 1.28 ; per le donne con stato nutrizionale sottopeso o normopeso questa era di 3.26 e deviazione standard ± 0.97 .

Le differenze fra le medie dei parametri di LDL, colesterolo totale e trigliceridi nei diversi stati nutrizionali non sono risultate statisticamente significative (*test t di Student*), mentre le differenze tra le medie di HDL e rapporto colesterolo totale-colesterolo HDL nei diversi stati nutrizionali sono risultate statisticamente

significative e i risultati sono riportati nella Tabella 33. La medesima elaborazione è stata fatta considerando le donne obese e quelle non obese, i risultati sono simili a quelli sopra elencati (tabella 34).

Stratificando la popolazione in base allo stato gestazionale e considerando solo le donne non in gravidanza è emerso che le donne sottopeso o normopeso presentavano valori medi di HDL più elevati rispetto alle sovrappeso o obese; valori medi di trigliceridi, colesterolo LDL e rapporto colesterolo totale- colesterolo HDL minori rispetto alle donne sovrappeso o obese. Tali differenze sono risultate statisticamente significative (tabella 35). Simili risultati sono stati ottenuti analizzando le donne obese e quelle non obese (tabella 36)

Successivamente, considerando le donne non in gravidanza, è stata analizzata una possibile correlazione tra il *body mass index* (BMI) ed il profilo lipidico, ed è risultato che esiste una correlazione negativa con il colesterolo HDL ($r_p = -0.243$, $p = 0.023$), una correlazione positiva con i trigliceridi ($r_p = 0.281$, $p = 0.008$), e con il rapporto tra colesterolo totale e colesterolo HDL ($r_p = 0.303$, $p = 0.004$) (Tabella 37).

Considerando la popolazione di 204 donne, ed osservando la media dei vari parametri in base ai genotipi si è riscontrato che per gli individui con genotipo AA o AG la media del valore di colesterolo HLD era di 59.6 mg/dL e la deviazione standard di ± 13.1 ; la media del valore di colesterolo LDL era di 112.2 mg/dL e la deviazione standard di ± 38.9 ; la media dei trigliceridi era di 130 mg/dL e la deviazione standard ± 71.4 ; la media del colesterolo totale era di 197.8 mg/dL e la deviazione standard ± 50 ; quella del rapporto fra colesterolo totale e colesterolo HDL era di 3.14 e la deviazione standard di ± 0.97 .

Per quanto riguarda gli individui con genotipo GG la media del valore di colesterolo HLD era di 63.4 mg/dL e la deviazione standard di ± 17.1 ; la media del valore di

colesterolo LDL era di 119.1 mg/dL e la deviazione standard di ± 44.1 ; la media dei trigliceridi era di 130 mg/dL e la deviazione standard ± 78.9 ; la media del colesterolo totale era di 207.9 mg/dL e la deviazione standard ± 56.9 ; quella del rapporto fra colesterolo totale e colesterolo HDL era di 3.48 e la deviazione standard di ± 1.2 .

Tutte queste differenze fra le medie dei suddetti parametri non sono risultate statisticamente significative. Questi risultati possono essere osservati nella Tabella 38. Successivamente, considerando la concentrazione sierica di HDL ed LDL nel sangue è stato possibile valutare il valore medio e la deviazione standard nelle due categorie di donne sottopeso o normopeso e sovrappeso o obeso in base al genotipo. In particolare, osservando il gruppo delle sottopeso o normopeso, e fra queste quelle che presentano il genotipo omozigote AA e l'eterozigote AG, è emerso che la concentrazione media di HDL mg/dl era di 61.4 con deviazione standard di ± 12.26 ; mentre considerando il genotipo omozigote GG la concentrazione media era del 65.6 mg/dl e la deviazione standard ± 16.4 . Nel gruppo delle sovrappeso-obese, invece, la concentrazione media di HDL era di 56.5 mg/dl e deviazione standard ± 14.0 considerando il genotipo omozigote mutato AA e l'eterozigote AG; mentre considerando il genotipo omozigote GG la media era 59.2 mg/dl e la deviazione standard ± 17.7 . Allo stesso modo, analizzando le concentrazioni medie dell'LDL queste erano: del 110.18 mg/dl e deviazione standard ± 38.14 per le donne sottopeso-normopeso considerando il genotipo omozigote AA e eterozigote AG, mentre era del 115.06 mg/dl e deviazione standard ± 40.58 per gli omozigoti *wild type*. Considerando il gruppo delle sovrappeso-obeso, la concentrazione media era del 115.6 mg/dl e deviazione standard ± 40.57 per il genotipo omozigote AA e eterozigote AG; mentre era del 126.49 mg/dl e deviazione standard ± 49.48 per il genotipo omozigote GG.

Osservando invece il rapporto fra colesterolo totale e colesterolo HDL è emerso che negli individui sottopeso-normopeso con genotipo GG (n=81) la media di questo rapporto era di 3.26 e deviazione standard \pm 1.0; per lo stesso gruppo, ma considerando i genotipi AA ed AG (n=49), la media era di 3.27 e deviazione standard \pm 0.91. Considerando il gruppo dei sovrappeso-obesi, e fra questi gli individui omozigoti *wild type* GG (n=43), si osserva che la media di questo rapporto era pari a 3.77 e deviazione standard \pm 1.43; fra i sovrappeso-obesi con genotipo AA ed AG (n=29) la media era di 3.67 e deviazione standard \pm 1.05 (Tabella 39a). Lo stesso test è stato fatto suddividendo le donne in obese e non obese, i risultati ottenuti sono sovrapponibili a quelli sopra descritti (tabella 39b.). Confrontando le medie dei valori del profilo lipidico nelle donne distinte per stato gestazionale e genotipo e considerando solo le donne non in gravidanza è emerso che nel gruppo con genotipo AG o AA, le donne presentavano medie dei valori di colesterolo HDL, colesterolo totale più elevate rispetto alle donne con genotipo GG (tabella 40). La stessa analisi è stata fatta considerando sole le donne in gravidanza (tabella 41).

È stata pure analizzata la possibile correlazione tra il BMI ed il profilo lipidico delle donne non in gravidanza e con genotipo AA o AG e successivamente con genotipo GG, i risultati sono mostrati nella tabella 42

4.6 Concentrazione della proteina C-reattiva nella popolazione (204 donne)

Per stratificare la popolazione in studio in base ai livelli di plasmatici della PCR, è stato utilizzato il documento *AHA/CDC Scientific Statement* (Person et al., 2003). Tale classificazione ci ha permesso di suddividere le donne con livello di PCR < 3 mg/L (basso) e donne con livello di PCR \geq 3 mg/L (alto).

Pertanto, considerando le 204 donne, è emerso che il 49.3% (n=100) delle donne presentava livelli di PCR < 3 mg/L (bassi), mentre il 50.7% (n=103) aveva livelli di PCR \geq 3 mg/L (elevati) (Tabella 43). La media dei livelli plasmatici di PCR è risultata 4.8 mg/L con deviazione standard \pm 6.4 mg/L e con un *range* di 0.0-57.0 mg/L.

Analizzando l'associazione tra i livelli di PCR e lo stato gestazionale, è emerso che tra le donne in gravidanza la maggior parte (68.4%) aveva livelli alti di PCR contro solo il 26.7% delle donne non in gravidanza ($p < 0.001$) (Tabella 44).

Utilizzando il *test t di Student*, si è osservato che la media dei livelli plasmatici di PCR tra le donne in gravidanza (6.4 mg/L \pm 7.5) era significativamente più alta delle donne non in gravidanza (2.6 mg/L \pm 3.6) ($p < 0.001$) (Tabella 45).

4.6.1 Associazione tra proteina C-reattiva ed età

Considerando la distribuzione in percentili dell'età della popolazione e il livello plasmatico di PCR è emerso che nella fascia più giovane, il 60.4% (n=32), aveva livelli di PCR < 3 mg/L mentre il 39.6% (n= 21) aveva livelli di PCR > 3 mg/L; nella fascia compresa fra i 24-28 anni il 38.9% delle donne (n= 21) aveva livelli di PCR < 3 mg/L mentre il 61.1% (n= 33) aveva livelli di PCR > 3 mg/L; in quella compresa tra i 29-34 anni il 38% (n= 19) aveva livelli di PCR < 3 mg/L mentre il 62% (n= 31) aveva livelli di PCR > 3 mg/L; nella fascia più anziana il 60.9 % (n=28) aveva livelli

di PCR < 3 mg/L mentre il 39.1% (n= 8) aveva livelli di PCR > 3 mg/L. Queste differenze sono risultate statisticamente significative. In particolare, le donne appartenenti alle due fasce centrali di età (24-28 e 29-34 anni) presentavano con maggiore frequenza livelli elevati di PCR mentre le donne nelle due fasce di età estreme presentavano con maggiore frequenza bassi livelli ($p= 0.019$) (Tabella 46); questo può essere spiegato dalla significativa presenza di donne in gravidanza nelle fasce di età centrali rispetto alle donne non in gravidanza, le quali invece sono maggiormente distribuite nella prima e nell'ultima fascia di età.

Successivamente, incrociando i livelli plasmatici di PCR per i percentili di età considerando anche lo stato di gravidanza, non emerge alcuna differenza statisticamente significativa (Tabelle 47 e 48).

4.6.2 Analisi dei livelli di proteina C- reattiva e genotipi

Dall'analisi divariata effettuata per verificare l'associazione tra i livelli plasmatici di proteina C- reattiva e il genotipo del polimorfismo in studio, è emerso che: il 51.6% (n= 65) delle donne con concentrazione ≥ 3 mg/L erano omozigoti *wild type* GG mentre il 49.4% (n=38) erano AG o AA. Considerando le donne con concentrazione < 3 mg/L, è emerso che il 48.4% delle donne erano omozigote *wild type* GG mentre il 50.6% erano AA o AG. Tali differenze non sono risultate statisticamente significative (Tabella 49)

Non emerge alcuna significatività statistica nella valutazione dell'associazione tra polimorfismo -308G>A e livelli di PCR anche considerando i percentili di età (Tabelle 50 e 51). Allo stesso modo, il genotipo non influenza significativamente l'associazione tra PCR e stato di gravidanza (Tabelle 52 e 53).

Confrontando le medie dei livelli di PCR in base al genotipo, è emerso che la media dei livelli di PCR tra le AG o AA (5.4 mg/L \pm 7.8) era più alta rispetto alla media dei livelli di PCR con genotipo GG (4.5 mg/L \pm 5.4) (Tabella 54).

Stratificando la popolazione in base allo stato di gravidanza, sono state confrontate le medie dei livelli di PCR ed il genotipo: si è osservato che la media dei livelli plasmatici di PCR nelle donne in gravidanza con genotipo AA o AG era più alta rispetto alle donne in gravidanza con genotipo *wild-type* GG (7.3 mg/L \pm 9.7 contro 5.9 mg/L \pm 6.7). Similmente, tra le donne non in gravidanza, quelle con genotipo AA o AG presentavano livelli medi di PCR più alti rispetto a quelle con genotipo *wild-type* GG (3.2 mg/L \pm 4.2 contro 2.2 mg/L \pm 3). Tali differenze non sono risultate statisticamente significative (Tabelle 55 e 56).

4.6.3 Analisi dei livelli di proteina C-reattiva e stato nutrizionale

Considerando solo le donne non in gravidanza, è stata analizzata l'associazione tra i livelli di PCR e lo stato nutrizionale, si è osservato che quelle con alto livello di PCR (\geq 3 mg/L) erano maggiormente donne sovrappeso o obese (44.7%, n=17), al contrario le donne con basso livello di PCR (< 3 mg/L) erano principalmente sottopeso o normopeso (87.5%, n=42) e queste differenze sono risultate statisticamente significative ($p= 0.001$) (Tabella 57). Stesso risultato è stato ottenuto confrontando le medie dei livelli di PCR in base allo stato nutrizionale nelle donne non in gravidanza e si è osservato che la media dei valori di PCR tra le donne sovrappeso o obese (4.097 mg/L) era significativamente più alta rispetto alle donne sottopeso o normopeso (1.481 mg/L) ($p= 0.001$) (Tabella 58)

Inoltre, stratificando per genotipo, è stata valutata l'associazione tra i livelli di PCR e lo stato nutrizionale. In particolare, in entrambi i gruppi di donne suddivise in base al

genotipo si osserva una maggiore frequenza di donne sovrappeso o obese con alti livelli di PCR rispetto alle donne sottopeso o normopeso ($p= 0.008$; $p= 0.03$) (Tabelle 59 e 60).

Le stesse elaborazioni sono state effettuate suddividendo le donne in obese e non obese, i risultati ottenuti sono paragonabili a quelli riscontrati sopra (Tabella 61, 62, 63).

È stata altresì valutata la possibile correlazione tra i livelli plasmatici di PCR, e tutti i parametri metabolici delle donne non in gravidanza, ed è emerso che la PCR correla positivamente con il *body mass index* ($r_p= 0.588$, $p< 0.001$) e i trigliceridi presenti nel sangue delle donne ($r_p= 0.254$, $p= 0.018$) (Tabella 64). Successivamente, la correlazione è stata calcolata considerando i differenti genotipi (AA+AG e GG). In particolare qualunque sia il genotipo analizzato, il segno della correlazione viene mantenuto rispetto a quello osservato considerando tutta la popolazione (Tabella 65).

II FASE DELLO STUDIO

4.7 Descrittiva della popolazione

In generale, considerando la frequenza dell'allele mutato è emerso che il 17.3% delle donne aveva genotipo AA o AG, mentre l'82.7% era GG (Tabella 66).

Dall'analisi dello stato nutrizionale si è potuto osservare che il 67.7% delle donne erano sottopeso o normopeso, mentre il 32.3% erano in sovrappeso o obese, in particolare le donne obese erano il 13.6% (Tabella 67).

E' stata valutata l'associazione tra genotipo e stato nutrizionale ma non sono emerse differenze statisticamente significative. Tuttavia, una maggiore percentuale di donne con genotipo AA o AG erano in sovrappeso o obese rispetto alle donne GG, anche considerando le donne obese rispetto tutte le altre donne (Tabella 68 a, b).

4.7.1 Analisi dell'*intake* di acidi grassi nelle 214 donne

Per la valutazione dell'*intake* di acidi grassi assunti mediante la dieta, sono stati analizzati gli FFQ delle 214 donne reclutate durante la seconda fase dello studio ed è stato possibile calcolare il consumo mensile degli acidi grassi assunti con la dieta. In particolare, le donne reclutate nella seconda fase dello studio consumavano in media al mese 996.6 gr di acidi grassi saturi (mediana 846.6 grammi; *range* 293.1 - 2933.4 grammi); 3852.7 gr di acidi grassi insaturi (mediana 2102.6 grammi; *range* 316.6 – 65534.2 grammi) di cui: 3300.5 gr di MUFA totali (mediana 1663.6 grammi; *range* 241.5 – 64589.7 grammi) e 552.2 gr di PUFA totali (mediana 470.4 grammi; *range* 75.1 – 2284.6 grammi).

E' stata calcolata la media e la deviazione standard dell'assunzione giornaliera di acidi grassi in base allo **stato nutrizionale**, ed è emerso che tutti i valori medi e le deviazioni standard erano più alti nelle donne sottopeso o normopeso. In particolare

differenze statisticamente significative si sono ottenute per gli SFA, i PUFA totali, e di questi ultimi l'LA, il GLA, l'ALA. Anche il rapporto tra acidi grassi insaturi e acidi grassi saturi è risultato più alto nelle donne sottopeso o normopeso nonostante non sia statisticamente significativo (Tabella 69).

Stessa analisi è stata fatta considerando lo **stato gestazionale**, ed è emerso che nelle donne in gravidanza i valori medi di acidi grassi insaturi, MUFA ed il rapporto acidi grassi insaturi/acidi grassi saturi erano più alti dei valori medi delle donne non in gravidanza, nonostante ciò tali differenze non sono risultate statisticamente significative (Tabella 70).

Prendendo in considerazione il **genotipo**, è emerso che le donne *wild type* GG avevano valori medi e deviazione standard di SFA, PUFA totali, LA, GLA, ALA, EPA, DHA, PA più alti rispetto alle donne con genotipo mutato AA o eterozigote AG. Invece, le donne con la presenza dell'allele mutato in omozigosi o eterozigosi avevano valori medi e deviazioni standard più alti di acidi insaturi, MUFA, e rapporto acidi grassi insaturi/acidi grassi saturi rispetto alle donne GG. Tali differenze non sono risultate statisticamente significative (Tabella 71).

Inoltre, sono state calcolate le medie e le deviazioni standard considerando sia il **genotipo che lo stato nutrizionale**. Analizzando inizialmente solo le donne con genotipo GG è emerso che, le sovrappeso o obese avevano tutti i valori medi e deviazioni standard di acidi grassi (sia saturi che insaturi) più bassi rispetto alle donne sottopeso o normopeso; la significatività statistica è stata ottenuta per *intake* di PUFA totali, LA, GLA, ALA, PA (Tabella 72).

Invece, confrontando le medie e le deviazioni standard per le donne AA o AG, si è potuto osservare che le sovrappeso o obese presentavano nuovamente, seppur in alcuni casi minima, una condizione sfavorevole, di *intake* di acidi grassi rispetto alle

sottopeso o normopeso. Queste ultime, nonostante la presenza dell'allele mutato avevano un *intake* di acidi grassi insaturi più alto rispetto alle donne sovrappeso o obese sebbene tali differenze non siano risultate statisticamente significative (Tabella 72).

In seguito, è stato calcolato il coefficiente di correlazione sia di Pearson che di Spearman, per la quantità di acidi grassi assunti in media giornalmente ed il BMI. Complessivamente, è stata evidenziata una correlazione negativa tra il BMI e gli acidi grassi, in particolare, all'aumentare dell'indice di massa corporea diminuiva l'assunzione media giornaliera di acidi grassi saturi ($r_p = -0.216$, $p = 0.014$); acidi grassi insaturi ($r_p = -0.178$, $p = 0.009$); PUFA totali ($r_p = -0.207$, $p = 0.002$); MUFA ($r_p = -0.171$, $p = 0.012$) (Tabella 74).

Valutando la popolazione in base alle **stato nutrizionale**, la correlazione si è mantenuta solo per le donne sottopeso o normopeso: acidi grassi saturi ($r_p = -0.235$, $p = 0.004$); acidi grassi insaturi ($r_p = -0.212$, $p = 0.01$); PUFA totali ($r_p = -0.235$, $p = 0.005$) MUFA ($r_p = -0.206$, $p = 0.013$). La stessa analisi è stata eseguita suddividendo le donne in obese e non obese, ottenendo, una correlazione negativa solo per le donne non obese (Tabella 75).

Esaminando solo le donne **non in gravidanza**, è stata evidenziata una correlazione negativa tra il BMI e gli acidi grassi, in particolare, all'aumentare dell'indice di massa corporea diminuiva l'assunzione media giornaliera di acidi grassi insaturi ($r_s = -0.266$, $p = 0.010$); PUFA ($r_s = -0.252$, $p = 0.014$) MUFA ($r_s = -0.222$, $p = 0.032$). La correlazione si è mantenuta considerando tra le **non in gravidanza solo le donne sottopeso o normopeso**: acidi grassi saturi ($r_s = -0.299$, $p = 0.018$); acidi grassi insaturi ($r_s = -0.266$, $p = 0.037$); PUFA ($r_s = -0.267$, $p = 0.036$) MUFA ($r_s = -0.229$, $p = 0.073$) (Tabella 76, 77).

La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori

Considerando la popolazione in base al **genotipo**, non è stata evidenziata nessuna correlazione tra il BMI e l'assunzione di acidi grassi.

5. DISCUSSIONE

Studi di epidemiologia genetica hanno dimostrato che gli individui con alcuni alleli HLA hanno un rischio più elevato di specifiche malattie autoimmuni. In particolare, diversi studi hanno evidenziato in tutte le popolazioni caucasiche, l'associazione tra la presenza di geni HLA-B8, aplotipo DR3 che fa parte dell' aplotipo ancestrale (AH) 8.1 HLA-A1, CW7, B8, TNFAB*a2b3, TNFN*S, C2*C, Bf *s, C4A* Q0, C4B*1, DRB1*0301, DRB3*0101, DQA1*0501, DQB1*0201 ed un numero elevato di malattie autoimmuni. Questo aplotipo, il più comune nella razza caucasica, è associato, anche in soggetti sani, con una serie di disfunzioni del sistema immunitario. E' stato evidenziato che alcuni specifici geni all'interno del 8.1 AH modificano la risposta immunitaria e quindi influenzano molteplici malattie immunopatologiche. In particolare, i geni del TNF, localizzati in questo aplotipo, potrebbero giocare un ruolo nell'influenzare le caratteristiche del 8.1 AH, cioè determinare forza, efficacia e durata delle reazioni infiammatorie locali e sistemiche. È stato osservato che i portatori dell' 8.1 AH sono grandi produttori di TNF- α : tale citochina viene codificata dal gene *fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α)* situato sul cromosoma 6. Questo geneticamente determina un'elevata espressione del *TNF- α* e quindi un'elevata produzione di TNF- α , la quale a sua volta potrebbe portare ad una predominanza nella risposta delle citochine di tipo 2. La prevalenza relativa alla produzione di citochine di tipo 2 gioca un ruolo importante nell'elevata incidenza di malattie autoimmuni in portatori 8.1 AH (Candore G et al., 2002).

Il TNF- α è una citochina pro-infiammatoria pleiotropica cioè in grado di svolgere numerose funzioni di regolazione sulle risposte immunitarie. IL TNF- α è anche un importante mediatore delle risposte infiammatorie sia acute che croniche. La

concentrazione del *TNF- α* aumenta durante i danni vascolari prodotti dalla formazione di trombi e durante stati infiammatori. Il gene del *TNF- α* ha vari siti polimorfici, tra cui un polimorfismo presente nella regione promotrice del gene in posizione -308. Questo polimorfismo consiste in una sostituzione di una G (guanina) con una A (adenina). Studi in vitro hanno messo in evidenza che la presenza dell'allele A può influire sulla regolazione dell'espressione del gene infatti è associata ad una maggiore produzione della molecola stessa. Inoltre, questo polimorfismo è considerato un marcatore per le malattie cardiovascolari (Joffe YT et al., 2010; Wilson et al. 1997; Herrmann, 1998).

L'obiettivo generale della ricerca qui presentata è stato quello di analizzare la distribuzione del polimorfismo -308 G>A del gene *TNF- α* in relazione allo stato di obesità in una popolazione di donne in età fertile.

In particolare, i risultati dello studio qui riportato hanno permesso di descrivere la popolazione in studio, in termini di stato nutrizionale (BMI), assunzione di micronutrienti, profilo lipidico e *marker* infiammatori, tenendo conto del polimorfismo genetico.

I risultati del nostro studio confermano quanto già riportato in letteratura: il **genotipo** più frequente è quello omozigote *wild type* GG (72.5%), seguito dall'eterozigote AG (26.1%) e dall'omozigote mutato AA (1.4%). La frequenza dell'allele mutato A è stata del 14.5%, simile a quanto riportato dai dati forniti dalla letteratura, i quali mostrano che la frequenza allelica del *TNF-308 A* nella popolazione è bassa (6-24%) e rimane tale anche quando viene identificata un'associazione con la malattia (Wirz, 2004). Le analisi del Chi quadrato e del test G hanno inoltre, confermato che la popolazione era in equilibrio di *Hardy-Weinberg* per il locus in studio. Il genotipo e la frequenza dell'allele A sono stati analizzati considerando anche l'etnia ma

dall'analisi bivariata non è emersa un'associazione statisticamente significativa e questo potrebbe essere spiegato dall'elevata numerosità delle donne caucasiche rispetto alle non caucasiche partecipanti al progetto.

Il *TNF- α* è implicato nello sviluppo dell'obesità (Wilson et al. 1997; Joffe YT et al., 2010), l'aumento dell'espressione di *TNF- α* nel tessuto adiposo ed il polimorfismo in posizione -308 nella regione promotore del *TNF- α* , hanno mostrato un incremento della trascrizione del gene negli adipociti (Romeo S. et al., 2001; Jae-Young Um et al., 2004). L'obesità è considerata una malattia multifattoriale dovuta agli effetti combinati di determinanti quali i geni, l'ambiente e le loro interazioni ed una conseguente alterazione del bilancio energetico ed accumulo eccessivo di tessuto adiposo nell'organismo (Arner P., 2000). Un gran numero di studi ha indagato sul ruolo di questi determinanti, spesso con risultati contraddittori. Così, la comprensione dei meccanismi attraverso i quali i fattori ambientali, come la dieta e l'attività fisica, interagiscono con fattori genetici è tuttora oggetto di studio (Nieters A et al., 2002).

Considerando lo **stato nutrizionale** della popolazione di donne in studio, è emerso che il 34.2% era in sovrappeso o obese. Queste donne, rispetto alle donne sottopeso o normopeso, avevano un'età significativamente più alta ($p= 0.002$), rafforzando quanto già riportato in letteratura (Joffe et al., 2010). Inoltre, la maggior parte delle donne in sovrappeso o obese avevano un livello di istruzione medio basso ($p= 0.014$) ed erano anche casalinghe ($p= 0.007$).

Considerando l'interazione tra **genotipo e stato nutrizionale** è emerso che le donne con genotipo mutato AA o eterozigote AG erano con più frequenza obese rispetto alle donne *wild-type*, in particolare le donne obese con genotipi AA o AG il hanno un rischio 2.9 volte più alto rispetto alle donne obese con genotipo *wild type* ($p= 0.11$;

IC95% = 1.25 – 6.6). Questi risultati confermano quanto riportato da altri studi (Norman et al., 1995; Fernandez-Real et al., 1997; Hoffstedt et al., 2000).

L'alto livello di coordinazione tra il sistema infiammatorio e quello metabolico è particolarmente evidente in condizioni di obesità. Durante tale stato gli adipociti diventano ipertrofici a causa dell'aumentato accumulo di trigliceridi. In tale condizione gli adipociti possono secernere MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein- 1*), una molecola che stimola l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo. Sia gli adipociti che i macrofagi producono altre chemochine e secernono sia il TNF- α che l'interleuchina 1 β ; avviando e potenziando una risposta infiammatoria (Tilg e Moschen, 2006; Guilherme et al., 2008). La letteratura internazionale ha sempre più sottolineato la fondamentale importanza dell'obesità che si è dimostrata essere, correlata con l'insulino-resistenza, l'intolleranza al glucosio, l'ipertensione, la dislipidemia aterogena, l'ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, alte concentrazioni di particelle LDL piccole e dense, stato trombotico e profilo infiammatorio generalizzato (Arner P., 1995; NCEP, 2002; Mokdad et al., 2003). Persone con sovrappeso o obesità presentano in genere una tipica alterazione del profilo lipidico, caratterizzata da ipertrigliceridemia, bassi valori del colesterolo HDL, LDL non aumentate quantitativamente ma con caratteristiche di maggiore densità e minori dimensioni (LDL piccole e dense) che contribuiscono in modo significativo all'aumentato rischio coronarico e cardiovascolare. E' interessante notare che la perdita di peso, tende a migliorare il profilo lipidico, riducendo la trigliceridemia, aumentando la colesterolemia HDL e modificando il *pattern* delle lipoproteine LDL (Mozaffarian et al., 2006).

Nella prima fase del nostro studio è stato analizzato il **profilo lipidico** e in particolare i valori di colesterolo HDL, colesterolo LDL e rapporto fra colesterolo

totale e colesterolo HDL e trigliceridi. Le donne in gravidanza presentavano in media valori del profilo lipidico significativamente più elevati rispetto alle donne non in gravidanza (Alvarez JJ et al. 1996; Brizzi P et al., 1999; Mankuta D et al., 2010).

Inoltre, i nostri risultati confermano quanto già dimostrato dalla letteratura internazionale, infatti prendendo in considerazione solo la popolazione di donne non in gravidanza, in quanto il profilo lipidico cambia significativamente con la maternità, i valori medi dell'HDL, erano più alti nelle donne sottopeso o normopeso rispetto a quelli delle donne sovrappeso o obese ($p= 0.01$). Invece, i valori medi dei trigliceridi e del rapporto colesterolo totale e colesterolo HDL erano più alti nelle donne sovrappeso o obese rispetto a quelle sottopeso o normopeso ($p= 0.01$; $p= 0.006$). Inoltre, questi risultati sono confermati anche dall'analisi della correlazione tra BMI e componenti del profilo lipidico.

Wang e Trayhurn, (2006) hanno ulteriormente confermato che il *TNF- α* è un potente regolatore delle molecole infiammatorie e favorisce l'instaurarsi di uno stato infiammatorio generale, ma, specialmente alti livelli di questa citochina sono associati a maggiori livelli di triacilgliceroli nel siero (TG), colesterolo VLDL e bassi livelli di colesterolo HDL circolante, in special modo se si considera la presenza del polimorfismo -308 G>A. I risultati ottenuti nel nostro studio dimostrano come, stratificando per stato gestazionale e considerando il genotipo, esiste una correlazione statisticamente significativa in cui, nelle donne con genotipo GG, all'aumentare del BMI diminuisce la concentrazione plasmatica di colesterolo HDL, invece nelle donne con genotipo AA o AG all'aumentare del BMI aumenta la concentrazione di trigliceridi. Pertanto l'allele A assumerebbe un ruolo di incremento del rischio, mentre il genotipo *wild-type* un significato protettivo.

Un eccessivo accumulo di grassi nel tessuto adiposo aumentano le concentrazioni ematiche di *marker* pro-infiammatori quali il *TNF- α* e la proteina C-reattiva (Maury e Brichard, 2010).

Valutando la distribuzione dei livelli di **proteina C-reattiva** nelle donne in studio, è emerso che la maggior parte aveva alti livelli di PCR. Stratificando in base allo stato di gravidanza, si è osservato che i valori più alti di PCR erano presenti nelle donne in gravidanza ($p < 0.001$). L'aumento dei livelli circolanti di PCR nelle donne in gravidanza rispetto alle donne non in gravidanza conferma i risultati già osservati in altri studi (Von Versen-Hoeynck et al., 2009).

Inoltre, nel nostro studio, abbiamo valutato le relazione tra obesità e livelli di PCR. E' stato riportato che l'obesità è associata ad elevate concentrazioni di PCR (Malavazos et al., 2007; Malavazos et al., 2007; Mohamed-Ali et al., 1997; Lemieux et al., 2001; Pou et al., 2007; Fontana et al., 2007), e che la perdita di peso comporta una sua diminuzione (Dietrich e Jialal, 2005; Selvin et al., 2007).

Incrociano i livelli di PCR con lo stato nutrizionale solo nelle donne non in gravidanza, in quanto i livelli di PCR variano significativamente durante il periodo gestazionale, è stato osservato che i livelli di PCR sono più elevati nelle donne sovrappeso o obese ($p = 0.001$). Inoltre, in entrambi i gruppi di donne suddivise in base al genotipo, si è osservato una maggiore frequenza di donne sovrappeso o obese con alti livelli di PCR rispetto alle donne sottopeso o normopeso, nonostante non sia stata raggiunta la significatività statistica.

Dati forniti dalla letteratura internazionale, hanno suggerito che la concentrazione plasmatica di PCR è associata significativamente con diversi fattori di rischio cardiovascolare, come l'età, il fumo, l'ipertensione, attività fisica, concentrazione plasmatica dei lipidi e BMI (Rohde et al., 1999). I risultati ottenuti dalla nostra

popolazione mostrano che esiste una significativa correlazione positiva tra i livelli plasmatici di PCR, i trigliceridi ed il BMI.

Considerando l'associazione tra i livelli di PCR e il genotipo, non sono risultate associazioni statisticamente significative, anche aggiustando per età e per stato di gravidanza, sebbene la media dei livelli plasmatici di PCR tra le donne non in gravidanza sia risultata più alta tra le donne con genotipo AA o AG rispetto alle donne con genotipo *wild-type* GG; risultati simili sono emersi anche per le donne in gravidanza.

Oltre alle influenze conferite dal *background* genetico, numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione circa il ruolo della dieta, in particolare **l'intake di acidi grassi** i quali determinano variazioni sui livelli di *TNF- α* , offrendo un'ulteriore spiegazione alla variabilità inter-individuale connessa all'obesità come stato infiammatorio. Gli acidi grassi poliinsaturi essenziali omega 3 e omega 6 sono noti soprattutto per la loro presenza ed il mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari. Gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) giocano un ruolo critico nel determinare le interazioni lipidi/proteine nelle membrane neuronali e sinaptiche, interferendo con la conformazione recettoriale, i canali ionici, gli enzimi ed i movimenti delle sostanze attraverso le membrane cellulari. La letteratura che descrive l'interazione gene-dieta che influenza l'espressione e/o la secrezione di *TNF- α* (Joffe YT et al., 2010; Stryjecki C. e Mutch DM, 2011) è di fondamentale importanza per contribuire a chiarire i meccanismi che vedono l'obesità come stato infiammatorio correlato con il polimorfismo del *TNF- α* . Anche nel nostro studio abbiamo voluto contribuire a tale argomento. Analizzando le donne reclutate nella seconda fase del progetto, è emerso che il BMI correla negativamente con l'assunzione degli acidi grassi sia saturi che insaturi in maniera statisticamente

significativa, anche considerando solo le donne non in gravidanza. Tuttavia, considerando l'interazione con il genotipo, non è stata evidenziata nessuna correlazione tra il BMI e gli acidi grassi. Il ruolo dei grassi assunti con la dieta nell'eziologia dell'obesità è stato affrontato in diversi studi ma rimane controverso. È ben documentato che ci sono notevoli differenze interindividuali che determinano particolari profili dei lipidi plasmatici in risposta all'assunzione di quantità di grassi e colesterolo con la dieta. Considerando che la società occidentale di oggi è caratterizzata da un'assunzione elevata di omega-6 e di piccole quantità di omega-3, da sedentarietà e da un'elevata prevalenza di obesità, diventa evidente che esiste la necessità di definire con precisione le esigenze nutrizionali in termini di assunzione di acidi grassi omega-6 e omega-3 (Simopoulos AP., 2010).

I risultati del nostro studio contribuiscono a chiarire il ruolo della dieta, del profilo lipidico e di alcuni *marker* infiammatori nello sviluppo dell'obesità, anche considerando il ruolo del genotipo nel modulare la risposta ai cambiamenti dei grassi assunti con la dieta.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica nel mondo, siamo infatti di fronte ad una vera e propria epidemia globale. Infatti, in molti Paesi dell' Europa, più della metà della popolazione adulta è in sovrappeso ed il 20-30% in una condizione di obesità (WHO, 2005). Come evidenziato anche nella Relazione sullo stato dei lavori della Commissione Europea nel campo della nutrizione, negli ultimi anni il sovrappeso e l'obesità sono aumentati ad un ritmo molto rapido e attualmente l'obesità rappresenta una priorità di intervento per la Sanità Pubblica. La dimensione del fenomeno è legata sia ai cambiamenti culturali, sociali ed economici che a stili di vita caratterizzati da un' alimentazione non corretta e dalla scarsa attività fisica. In questo

**La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori**

contesto divengono urgenti azioni integrate ed intersettoriali che diffondano nella popolazione informazioni sui rischi legati al sovrappeso e all'obesità e promuovano stili di vita sani.

6. CONCLUSIONI E PROGETTI FUTURI

Malattie a eziologia multifattoriale come il diabete, l'ipertensione arteriosa, l'aterosclerosi, il cancro ma in particolare l'obesità si sono diffuse in maniera epidemica negli ultimi cinquant'anni, e le loro manifestazioni cliniche si presentano in età o momenti sempre più precoci della vita, basti pensare all'obesità e al diabete tipo 2 nei bambini (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Mann NJ., 2004). La diffusione di queste malattie riproduce molto da vicino l'andamento geografico dei processi di urbanizzazione e industrializzazione. Poiché non è possibile immaginare variazioni sostanziali nel patrimonio genetico umano in un arco di tempo così limitato, queste osservazioni epidemiologiche fanno supporre che, sebbene la suscettibilità genetica abbia un ruolo importante nella eziologia di queste malattie, tuttavia essa può essere modulata da fattori non genetici largamente legati allo stile di vita, il quale si è rapidamente modificato nell'ultimo secolo come conseguenza della progressiva industrializzazione (Mann NJ., 2004). Infatti, un problema aggiuntivo di non facile approccio metodologico nello studio dell'epidemiologia genetica delle malattie complesse è rappresentato dall'interazione gene-ambiente. Lo studio dell'associazione tra varianti genetiche e tratti complessi è, ulteriormente aggravato dall'effetto modulante dei fattori ambientali che possono esercitare un ruolo confondente, difficile da stimare, e che potrebbe in parte spiegare la mancata replicazione dei risultati degli studi di associazione (Davey Smith G e Ebrahim S., 2003).

In questi anni il nostro gruppo di ricerca si è interessato a studiare e chiarire i meccanismi che si innescano nell'ambito della suscettibilità genetica alle malattie multifattoriali, frequenti nella popolazione, in particolare dell'obesità. Scopo del

nostro studio è stato quello di indagare in una popolazione catanese il ruolo della variante G-308A *TNF- α* nell'obesità e di studiarne la sua relazione con il profilo lipidico, *marker* infiammatori e la dieta. I nostri risultati suggeriscono che la mutazione G-308A del gene del *TNF- α* svolge un ruolo importante nell'obesità poiché le donne con genotipo mutato AA o eterozigote AG erano con più frequenza in sovrappeso o obese rispetto alle donne *wild-type*, inoltre le donne obese AA o AG hanno un rischio di 2.9 volte maggiore rispetto alle donne obese *wild type*; sebbene, non ci siano dati statisticamente significativi che spieghino la probabile associazione tra il genotipo, i parametri lipidici e *marker* infiammatori. Tuttavia, i nostri risultati confermano quanto già osservato in altri studi: lo stato nutrizionale modula significativamente il profilo lipidico e la proteina C-reattiva, inoltre, vi è una significativa correlazione tra il BMI ed i parametri sopra definiti. Per quanto riguarda l'interazione gene-dieta, anche se i risultati non mostrano un'interazione tra il genotipo *TNF α* -308 G>A e l'assunzione di acidi grassi, è emerso che il BMI correla negativamente con l'assunzione degli acidi grassi sia saturi che insaturi in maniera statisticamente significativa.

Il ruolo della dieta, dello stile di vita, quali determinanti delle malattie cronico-degenerative, viene concordemente accettato dalla comunità scientifica. Questi fattori occupano una posizione di rilievo nelle strategie di prevenzione poiché le abitudini alimentari svolgono un ruolo fondamentale nella promozione e nel mantenimento di un buono stato di salute. In particolare, il ruolo dei grassi della dieta nell'eziologia dell'obesità è stato affrontato in diversi studi ma rimane tuttavia controverso.

Questo nostro studio è stato limitato all'analisi di un solo polimorfismo a singolo nucleotide e di un solo gene. Studi dimostrano che esistono più di 100 geni che

hanno la capacità di influenzare l'obesità (Chagnon et al., 1998). Inoltre, per confermare e chiarire il ruolo del polimorfismo -308 G>A del gene *TNF α* nell'obesità sarà necessario studiare una popolazione più ampia, poiché si tratta di un SNP che ha una bassa frequenza, in più, considerando le possibili differenze nella struttura genetica delle popolazioni, questo risultato necessita di essere rinnovato in popolazioni con diversa origine etnica, poiché il gruppo delle donne non caucasiche nel nostro studio era esiguo. Limitazioni dello studio riguardavano anche la mancata possibilità di analizzare le associazioni tra profilo lipidico, *marker* infiammatori e dieta, poiché questi parametri sono stati studiati in fasi differenti del progetto e coinvolgevano donne diverse. Di conseguenza, sarà oggetto di studio nel futuro andare a valutare l'interazione tra acidi grassi, lipidi e genotipo, poiché, in recenti lavori è stata osservata l'interazione tra acidi grassi insaturi n-3, polimorfismo *TNF α* -308 G>A e rapporto colesterolo totale/colesterolo HDL (Joffe et al., 2010). Inoltre, un aumento dell'assunzione di acidi grassi polinsaturi è stato associato ad un aumento della concentrazione di colesterolo LDL solo in soggetti con l'allele *TNF- α* -308 A (Joffe et al., 2010).

Fontaine-Bisson et al. (2007) hanno osservato che l'assunzione di acidi grassi polinsaturi era inversamente associato con le concentrazioni di colesterolo HDL in portatori dell'allele A del *TNF- α* -308, ma non in quelli con genotipo GG. I dati forniti dalla letteratura suggeriscono che i fattori genetici, che influiscono sulla produzione di *TNF α* o sullo stato infiammatorio delle cellule, possono spiegare alcune delle variabilità nella risposta dietetica ai grassi (Fontaine-Bisson B. et al., 2007; Fontaine-Bisson B e El-Sohemy A., 2008). L'effetto dell'assunzione di PUFA sulla produzione di *TNF α* può essere dovuto ad uno stato infiammatorio preesistente (Wallace FA et al., 2000; Grimble RF et al., 2002; Fontaine-Bisson B e El-Sohemy

A., 2008). È possibile che lo stato infiammatorio intrinseco, a causa di una condizione preesistente, come obesità e/o il genotipo, possa determinare un effetto pro o anti-infiammatorio dei grassi alimentari nel modulare le concentrazioni dei lipidi nel siero. I dati suggeriscono che la presenza dell'allele mutato A di per sé non rappresenta un fattore causale, ma piuttosto può essere indicativo di una maggiore reattività o sensibilità di un individuo ai cambiamenti nella dieta (Corella D, Ordovas JM., 2005). Studi futuri saranno necessari per identificare tra i geni quelli responsabili nel modulare la risposta alla dieta. Inoltre, data la complessità delle interazioni gene-dieta, è importante sottolineare che, le differenti risposte alla dieta non sono determinate solo dai polimorfismi genetici ma anche dal “*fetal programming*”, dall'età, dallo stile di vita, da variabili nutrizionali e fisiologiche (Caramia G., 2010).

Negli ultimi anni, il concetto di “dieta” ha subito una radicale trasformazione fino al punto da attribuire agli alimenti, oltre alle classiche proprietà nutrizionali e sensoriali, anche un importante ruolo nel mantenimento di un corretto stato di salute e nella riduzione dell'insorgenza di alcuni tipi di patologie. I nutrienti giocano un ruolo fondamentale, dunque, non solo nei processi metabolici (agendo come substrati, coenzimi o cofattori per tali processi) ma anche nella regolazione dell'espressione genica. Le interazioni gene-gene e gene-nutrienti possiedono il potenziale di influenzare ogni momento della vita: il concepimento, la crescita e lo sviluppo; la durata della vita in buona salute e, addirittura, avere un ruolo tutt'altro che secondario nelle malattie che provocano la morte. Fattori di rischio per molte delle principali malattie cronico-degenerative sono spesso osservati durante l'infanzia. Misure preventive da adottare saranno necessarie non solo fin dai primi anni di vita, ma anche durante la gravidanza, in quanto possono aiutare a ridurre la

prevalenza di queste malattie in età adulta (Pérusse L e Bouchard C., 2000). Pertanto, data la complessità della patogenesi dell'obesità, l'obiettivo a lungo termine del nostro progetto sarà quello di approfondire le conoscenze sull'interazione tra la dieta, i geni e lo stato nutrizionale, comprendere le misure correttive e preventive da adottare in una più efficace strategia di prevenzione dell'obesità.

7. BIBLIOGRAFIA

AA.VV. *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology.* Circulation 1996;93:1043-65.

Ablij H, Meinders A (2002). *C-reactive protein: history and revival.* Eur J Intern Med, 13, 412.

Adult Treatment Panel III: *Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.* Circulation 106:3143–3421, 2002.

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE et al. (1985). *Human tumour necrosis factor.* Journal of Biological Chemistry, 1985. 260: 2345-2354.

Agodi et al. (2010). *Professione igienista - manuale dell'igiene ambientale e territoriale.* Casa Editrice Ambrosiana.

Allen LH. 2005. *Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview.* Am J Clin Nutr 81: 1206S–1212S.

Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, Lasunción MA, Herrera E, Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, Lasunción MA, Herrera E: Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass and postheparin lipases during gestation in women. *J Lipid Res* 1996, 37(2):299-308.

Ames BN. *The metabolic tune-up: Metabolic harmony and disease prevention.* J Nutr. 2003; 133 (5 suppl.1): S1544-S1548.

Andersen RE. *The spread of the childhood obesity epidemic [commentary].* CMAJ 2000;163:1461-2.

Ando M, Sanaka T, Nihei H. *Eicosapentaenoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation in dialysis patients.* J Am Soc Nephrol 1999;10:2177-84.

Araújo F., AC. Pereira, GF. Mota, M. Latorre, JE. Krieger, AJ. Mansur, (2004). *The influence of tumor necrosis factor α 308 and C-reactive protein G1059C gene variants on serum concentration of C-reactive protein: evidence for an age-dependent association.* Heart Institute (InCor), and Internal Medicine Department, São Paulo University Medical School, São Paulo, Brazil.

Arner P. (1995). *Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues.* Ann Med 27:435– 438.

Arner P. (2000). *Hunting for human obesity genes? Look in the adipose tissue!* Int J Obes Relat Metab Disord 24. (Suppl 4):S57–62.

Ateo A., Kinikli G., Düzgün N., Duman M., (2006). *Lack of association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with disease susceptibility and severity in Behçet's disease*. *Rheumatol Int* 26:348–353.

Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A (2007). *Interleukin- 10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis*. *J Clin Immunol* 11 (Epub ahead of print).

Barron HV, Viskin S. *Autonomic markers and prediction of cardiac death after myocardial infarction*. *Lancet* 1998;351:461-2.

Basu S., Haghiac, Surace, Challier, Guerre-Millo, Singh, Waters, Minium, Presley, Catalano, Hauguel-de Mouzon. *Pregavid Obesity Associates With Increased Maternal Endotoxemia and Metabolic Inflammation*, 2010.

Baugh, J.A., Bucala, R., 2001. *Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease*. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 4, 635–650.

Baugh, J.A., Bucala, R., 2001. *Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease*. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 4, 635–650.

Bazzano L A, He J, Muntner P, et al (2003). Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med*, 138, 891-7.

Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease*. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(Suppl 1):339S-42S.

Bendahhou S, Cummins TR, Agnew WS. *Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids*. *Am J Physiol* 1997;272:C592-600.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. *Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. *Circulation* 1992;85:1046-55.

Bingham S (1987): *The dietary assessment of individuals; methods, accuracy, new techniques and recommendations*. *Nutr Abstract and Rev.* 57, (10), 705-742.

Black S, Kushner I, Samols D. (2004). *C-reactive protein*. *J Biol Chem*; 279: 48487–90.

Board of Science. *Early life nutrition and lifelong health*. 2009

Bonaa KH, Bjerve KS, Straume B, Gram IT, Thelle D. *Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension: a population based intervention trial from the Tromso Study*. *N Engl J Med* 1990;322:795-801.

Bradley RL, Fisher FF, Maratos-Flier E (2008). *Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes*. *Obesity (Silver Spring)* 16, 938–944.

Brand, E., Schorr, U., Kunz, I., Kertmen, E., Ringel, J., Distler, A., Sharma, A.M., 2001. *Tumor necrosis factor-alpha-308 G/A polymorphism in obese Caucasians*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 25, 581–585.

Brighenti F, Valtueña S, Pellegrini N, et al (2005). *Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects*. Br J Nutr, 93, 619-25.

Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, SchreuderGM, Hazes JM, et al. *Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease?* Br J Rheumatol 1997; 36:516–21.

Brizzi P, Tonolo G, Esposito F, Puddu L, Dessole S, Maioli M, Milia S: *Lipoprotein metabolism during normal pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1999, 181(2):430-4.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C et al. *Polymorphism in tumour necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis*. Journal of Experimental Medicine, 1995; 182: 1259-1264.

Caceres-Dittmar, G., F.J. Tapia, M.A. Sanchez, M. Yamamura, K. Uyemura, R.L. Modlin, B.R. Bloom, and J. Convit (1993). *Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction*. Clin. Exp. Immunol; 91:500-505.

Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C. (2001). *Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions*. Autoimmunity Reviews 1 29–35.

Candore G., Lio D, Colonna Romano G and Caruso C., (2002). *Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interaction*. Autoimmunity Reviews 1 29-35.

Caramia G.(2010). *From food to nutrigenomic: state of art*. Ped. Med. Chir. 32: 145-160.

Carroll MC, Katzman P., Alicot EM., Koller BH., Geraghty DE., Orr HT., Strominger JL. And Spies T., (1987). *Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes*. Proc Natl Acad Sci 84:8535–8539.

Caruso C., Candore G., Colonna Romano G., et al., (2000). *HLA, aging and longevity: A critical reappraisal*. Human Immunol; 61:942-9.

Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. *The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil*. Am J Clin Nutr. 1996 Jan;63(1):116-22.

Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK (2007). *Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)- dependent pathway*. Cell Death Differ 14, 1361–1373.

Cawthorn WP, Sethi JK (2008). *TNF-alpha and adipocyte biology*. FEBS Lett 582, 117–

131.

Chagnon YC, Pérusse L, Bouchard C. *The human obesity gene map: the 1997 update*. *Obes Res*. 1998; 6:76–92.

Chagnon YC, Perusse L, Lamothe M, Chagnon M, Nadeau A, Dionne FT et al. (1997). *Suggestive linkages between markers on human 1p32–p22 and body fat and insulin levels in the Quebec family Study*. *Obes Res* 5, 115–121.

Christensen JH, Dyerberg J, Schmidt EB. *n-3 fatty acids and the risk of sudden cardiac death assessed by 24-hour heart rate variability*. *Lipids* 1999;34(Suppl):S197.

Christensen JH, Skou HA, Fog L, Hansen V, Vesterlund T, Dyerberg J, et al. *Marine n-3 fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography*. *Circulation* 2001;103:651-7.

Christensen JH, Skou HA, Madsen T, Torring I, Schmidt EB. *Heart rate variability and n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with diabetes mellitus*. *J Intern Med* 2001;249:545-52.

Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M: *Increased expression of tumor necrosis factor- α in diabetic macrovasculopathy*. *Cardiovasc Pathol* 1999, 8:145-151.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-KB and cytokine inducible enhancers*. *FASEB J* 1995;9:899-909.

Corella D, Ordovas JM. *Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: interaction with dietary factors*. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:341–90.

Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, et al. *The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss*. *Obes Surg* 2004; 14:589–600.

Cuenca J., Perez CA., Aguirre AJ., Schiattino I. and Aguillon JC., (2001). *Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population*. *Biol Res* 34:237–241.

D'Alfonso S. and Richiardi PM., (1994). *A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF- α promoter region*. *Immunogenetics* 39:150–154.

D'Amicis A (1999): *Valutazione dello stato di nutrizione*. In: *Fondamenti di nutrizione umana*, eds. Mariani Costantini A, Cannella C, Tomassi G, 417

Davey Smith G, Ebrahim S. (2003). *Mendelian randomization: Can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease?*. *Int J Epidemiol* 32: 1–22.

Davis MD, Erica C., Valerie D. and Callender MD., 2010. *A review of Acne in Ethnic Skin*. *J Clin Aesthetic Dermatol* 2010;3(4):24-38.

- DAWKINS, R. *et al.* 1999. *Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease*. Immunol. Rev. 167: 275–304.
- De Caterina R, Cybulsky MA, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P. *Omega-3 fatty acids and endothelial leukocyte adhesion molecules*. Prostagl Leukotr Ess Fatty Acids 1995;52:191-5.
- de Maat MP, Pietersma A, Kofflard M, Sluiter W, Kluft C: *Association of plasma fibrinogen levels with coronary artery disease, smoking and inflammatory markers*. *Atherosclerosis* 1996, 121:185-191
- Dei Cas L, Nodari S. *Ruolo degli acidi grassi poliinsaturi PUFA n-3 nella prevenzione della morte improvvisa*. Excerpta Medica 2003.
- Dei Cas L., Nodari S., Manerba A. (2007) *Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs)*. G Gerontol; 55:45-57
- Despres JP, Krauss RM. *Handbook of Obesity*, 1998, pagg 651-75.
- Devaraj Sridevi, Grant O'Keefe, and Ishwarlal Jialal, *Defining the Proinflammatory Phenotype Using High Sensitive C-Reactive Protein Levels as the Biomarker* (2005).
- Diabetes Prevention Program Research Group: *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Eng J Med 346: 393–403, 2002.
- Dietrich M, Jialal I (2005). The effect of weight loss on a stable biomarker of inflammation, C-reactive protein. Nutr Rev, 63, 22-8.
- Dietrich M, Jialal I (2005). The effect of weight loss on a stable biomarker of inflammation, C-reactive protein. Nutr Rev, 63, 22-8.
- DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R (1998). *Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum*. Am J Physiol 274, R1460–R1467.
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A et al. (2010). *Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution and link with lipid metabolism and fat mass loss*. Diabetes 59, 2817–2825.
- Documento di lavoro Relazione sullo stato dei lavori della Commissione europea nel campo della nutrizione in Europa. Ottobre 2002.
http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/nutritionreport_it.pdf
- Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. *Childhood obesity: Public-health crisis, common sense cure*. Lancet 2002;360:473-82.
- Eckel R H, Grundy S M, Zimmet P Z (2005). *The metabolic syndrome*. Lancet, 365, 1415-28.
- Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW et al.

(1989). *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells.* N Engl J Med 320, 265–271.

Executive summary of the *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III).* JAMA 2001;285:2486-97.

Faintuch J, Marques PC, Bortolotto LA, et al. *Systemic inflammation and cardiovascular risk factors: are morbidly obese subjects different.* Obes Surg 2008; 18:854–62.

Fernandez-Real, J.M., Gutierrez, C., Ricart, W., Casamitjana, R., Fernandez Castaner, M., Vendrell, J., Richart, C., Soler, J., 1997. *The TNF-alpha gene NcoI polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels.* Diabetes 46, 1468–1472.

Ferro-Luzzi A & Leclercq C (1993): *Nutritional surveillance: an outline.* In: *Food and Nutrition Policy in Europe*, eds. Van der Heij DG, Lowik MRH, Ochuysen T, 113-117. The Hague Wageningen: Pudoc Scientific

Fontaine-Bisson B, El-Sohemy A. *Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha modify the association between dietary polyunsaturated fatty acids and plasma high-density lipoprotein-cholesterol concentration in a population of young adults.* J Nutrigenet Nutrigenomics. 2008;1:215–23.

Fontaine-Bisson B, Wolever TM, Chiasson JL, Rabasa-Lhoret R, Maheux P, Josse RG, Leiter LA, Rodger NW, Ryan EA, et al. *Tumor necrosis factor alpha -238G.A genotype alters postprandial plasma levels of free fatty acids in obese individuals with type 2 diabetes mellitus.* Metabolism. 2007;56:649–55.

Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans.* Diabetes 2007;56:1010–1013.

Fox PL, Di Corleto PE. *Fish oil inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein.* Science 1988;241:453-6.

Fruhbeck G. *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders.* Methods Mol Biol 2008; 456:1–22.

Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Burmester, G.R., Dougados, M., Emery, P., Gibofsky, A., Kavanaugh, A.F., Keystone, E.C., et al., 2003. *Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other immune mediated inflammatory diseases.* Ann. Rheum. Dis. 62 (Suppl 2), ii2–ii9

Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Burmester, G.R., Dougados, M., Emery, P., Gibofsky, A., Kavanaugh, A.F., Keystone, E.C., et al., 2003. *Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other immune mediated inflammatory diseases.* Ann. Rheum. Dis. 62 (Suppl 2), ii2–ii9

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR (2010). *Adipose tissue as an endocrine organ.* Mol Cell Endocrinol 316, 129–139.

Gallicchio L, Chang HH, Christo DK et al. *Single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes and all-cause and cause-specific mortality: a prospective cohort study.* BMC Medical Genetics 2009; 10:103.

Garrod A, *The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality,* Lancet 2, 1616

Gensini GF, Comeglio M, Colella A: *Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease.* Eur Heart J 1998, 19(Suppl A):A53-A61.

Gillies PJ. *Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition.* J Am Diet Assoc. 2003; 103: S50-S55.

Gore SA, Brown DM, Smith West D. The role of postpartum weight retention in obesity among women: a review of the evidence. *Ann Behav Med* 2003;26:149–159.

Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G, Turner SJ, Markovic O, Hirrell S, East JM, Calder PC. *The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production.* Am J Clin Nutr. 2002;76:454–9.

GRUEN, J.R. & S.M. WEISSMAN. 1997. *Evolving views of the major histocompatibility complex.* Blood 90: 4252–4265.

Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2595- 600.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367-377.

Gustafson B. (2010). *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis.* J Atheroscler Thromb 17, 332–341.

Haglund O, Metha JL, Saldeen T. *Effect of fish oil on some parameters of fibrinolysis and lipoprotein a in healthy subjects.* Am J Cardiol 1994;74:189-92.

Hansen JB, Olsen JO, Wilsgard L, Osterud B. *Effects of dietary supplementation with cod liver oil on monocyte thromboplastin synthesis, coagulation and fibrinolysis.* J Intern Med 1989;225:133-9.

Harris WS. *N-3 fatty acids and serum lipoproteins; human studies.* Am J Clin Nutr 1997;65(5 Suppl):S1645-54.

Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F. *Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity.* Eur J Clin Invest 1998;28:59–66.

Higuchi T., Seki N., Kamizono S., Yamada A., Kimura A., Kato H. et al., (1998). *Polymorphisms of the 5' flanking region of the human tumor factor-alpha gene in Japanese.* Tissue Antigens 51:605-612.

Hoffstedt J., P. Eriksson, L. Hellstrom, S. Rossner, M. Rydèn, P. Arner (1999). *Excessive fat accumulation is associated with the TNF α -308 G/A promoter polymorphism in women but not in men*. *Diabetologia*; 43: 117-120.

Höhler T, S Grossmann, B Stradmann-Bellinghausen, W Kaluza, E Reuss, K de Vlam, E Veys, E Märker-Hermann, *Differential association of polymorphisms in the TNF α region with psoriatic arthritis but not psoriasis*, 2002.

Hopper JL. *The epidemiology of genetic epidemiology*. *Acta Genet Med Gemellol* 1992; 41: 261-73.

HORTON R. et al., *Gene map of the extended human major histocompatibility complex*, *Nature Reviews Genetics* 5, 889-899, 2004.

Hu, F.B., Meigs, J.B., Li, T.Y., Rifai, N., Manson, J.E., 2004. *Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women*. *Diabetes* 53, 693–700.

Institute of Medicine. *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington, DC: National Academy Press, 2000:196–305.

Institute of Medicine. *Nutrition during pregnancy, weight gain and nutrient supplements. Report of the Subcommittee on Nutritional Status and Weight Gain During Pregnancy*, Committee on Nutritional Status During Pregnancy and Lactation, Food and Nutrition Board. (1990).

International Conference on Population and Development. Report, Il Cairo, 5-13 settembre 1994: numero del documento A/CONF.171/13, 18 ottobre 1994. La citazione si trova nel Capitolo 7, N. 7.2. Si veda il rapporto *Reproductive Health*, N. 1.

Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN). *Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana*. 2003.

Istituto Superiore di Sanità, 2011

James MJ, Cleland LG. *Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis*. *Semin Arthritis Rheum* 1997;27:85-97.

Jaye D L, Waites K B (1997). *Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics*. *Pediatr Infect Dis J*, 16, 735-46; quiz 746-7.

Jeanmonod P., R. Kanel, Fe. Maly, J E. Fischer, 2004. *Elevated Plasma C-Reactive Protein in Chronically Distressed Subjects Who Carry the A Allele of the TNF α -308 G/A Polymorphism*. *Psychosomatic Medicine* 66:501–506 (2004) 501.

Jendraschak E, Kaminski WE, Hessel F, Kiefl R, von Schacky C. *Dietary omega3 fatty acids lower levels of platelet – derived growth factor mRNA in human mononuclear cells*. *Blood* 1993;81:1871-9.

Joffe YT, van der Merwe L, Carstens M, Collins M, Jennings C, Levitt NS, Lambert EV, Goedecke JH, (2010). *Tumor necrosis factor-alpha gene -308 G/A polymorphism*

modulates the relationship between dietary fat intake, serum lipids, and obesity risk in black South African women. J Nutr.;140(5):901-7.

Kac Gilberto, Juliana dos Santos Vaz, Michael Maia Schlüssel and Anibal Sanchez Moura. *C-reactive protein and hormones but not IL-6 are associated to body mass index in first trimester of pregnancy*, 2010.

Kang JX, Leaf A. *Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids.* Recent studies. Circulation 1996;94:1774-80.

Kaput J, Rodriguez RL. *Nutritional genomics: The next frontier in the postgenomic era.* Physiol Genomics. 2004; 16: 166-177.

Karastergiou K, Mohamed-Ali V (2010). *The autocrine and paracrine roles of adipokines.* Mol Cell Endocrinol 318, 69–78.

Kelemen LE. *GI Epidemiology: nutritional epidemiology.* Aliment Pharmacol Ther 2007; 25, 401–407

Khoury MJ. *Genetic Epidemiology and the future of disease prevention and public health.* Epidemiol Rev 1997; 19: 175-180.

Kim TG, Pyo CW., Hur SS., Kim YK., Hwang HY., Youn JI. and Kim TY., (2003). *Polymorphisms of tumor necrosis factor (TNF) alpha and beta genes in Korean patients with psoriasis.* Arch Dermatol Res 295:8–13.

Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., Fischer, H.G., Lowel, H., Doring, A., Hutchinson, W.L., Pepys, M.B., 1999. *C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992.* Circulation 99, 237–242

Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J., 1997. *The - 308 tumor necrosis factor—alpha promoter polymorphism effects transcription.* Mol. Immunol. 34, 391–399.

La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. *Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators.* Lancet 1998;351:478-84.

Lakka, T.A., Lakka, H.M., Rankinen, T., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Bouchard, C., 2005. *Effect of exercise training on plasma levels of C-reactive protein in healthy adults: the HERITAGE Family Study.* Eur. Heart J. (Jun 29 Epub ahead of print).

Leaf A, Xiao YF, Kang JX. *Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002;67:113-20.

Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D et al. *Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:961–967.

Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D *et al.* *Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:961–967.

Lopalco PL, Tozzi AE. *Epidemiologia facile.* Il pensiero Scientifico Editore, 2003.

Majser P, Grimm H, Grimminger F. *N-3 fatty acids in psoriasis.* *Br J Nutr.* 2002;87(Suppl 1):S77-82.

Makrides M, Neumann M, Simmer K, Pater J, Gibson R. (1995). *Are Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids Essential Nutrients in Infancy?* *Lancet* 345:1463–1468.

Malavazos AE, Corsi MM, Ermetici F *et al.* *Proinflammatory cytokines and cardiac abnormalities in uncomplicated obesity: relationship with abdominal fat deposition.* *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:294–302

Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. (2010). *Lipid profile in consecutive pregnancies.* *Lipids Health Dis.* 9:58.

Mann NJ. *Paleolithic nutrition: what can we learn from the past?.* *Asia Pac J Clin Nutr* 13: S17–23, 2004.

Mantovani V, Corazza GR, Bragliani M, Frisoni M, Zaniboni MG, Gasbarrini G. *Asp57-negative HLA DQ β chain and DQA1*0501 allele are essential for the onset of DQw2-positive and DQw2-negative coeliac disease.* *Clin Exp Immunol* 1993: 91: 153-6.

Manuale INRAN di sorveglianza nutrizionale 2003.

Maury E, Brichard SM (2010). *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and tabolic syndrome.* *Mol Cell Endocrinol* 1314, 1–16.

McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. *Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.* *Nature* 1994; 371:508–10.

McGuire W, Knight JC, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. *Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles.* *J Infect Dis.* 1999; 179:287–90.

Medical Research Council Vitamin Study Research Group (1991). *Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study.* *Lancet* 338, 131–137

Mendel JG. *The origins of genetics: a Mendel source book (translation).* In Stern C, Sherwood E, eds. San Francisco: Freeman, 1966, 1-48.

Milner JA. *Molecular targets for bioactive food components.* *J Nutr* 2004; 134: 2492s-8s.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A *et al.* *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo.* *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4196–4200

Mokdad A.H., Ford E.S., Bowman B.A., Dietz W.H., Vinicor F., Bales V.S., Marks J.S. *Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors*, 2001. *JAMA* 2003; 289: 76–9.

Molvarec A, Jermendy A, Nagy B et al., *Association between tumor necrosis factor (TNF)- α G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction*. *Clinica Chimica Acta* .2008; 392 52-57.

Momiyama Y, Ohmori R, Fayad ZA, Kihara T, Tanaka N, Kato R et al. (2010). *Associations between plasma C-reactive protein levels and the severities of coronary and aortic atherosclerosis*. *J Atheroscler Thromb* 17, 460–467.

Montori VM, Farmer A, Wollan PC, Dinneen SF. *Fish oil supplementation in type 2 diabetes: a quantitative systematic review*. *Diabetes Care* 2000;23:1407-15.

Mori TA, Beilin LJ. *Long-chain omega-3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction*. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:11-7.

Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. *Trans fatty acids and cardiovascular disease*. *N Engl J Med* 2006; 354: 1601-13.

Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. *The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study*. *Am J Clin Nutr* 2002;76:614 –9.

Mutch DM, Tordjman J, Pelloux V, Hanczar B, Henegar C, Poitou C et al. (2009b). *Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles*. *Am J Clin Nutr* 89, 51–57.

Nair S, Lee YH, Rousseau E, Cam M, Tataranni PA, Baier LJ et al. (2005). *Increased expression of inflammation-related genes in cultured preadipocytes/stromal vascular cells from obese compared with non-obese Pima Indians*. *Diabetologia* 48, 1784–1788.

Nanri Akiko, Malcolm A Moore, Suminori Kono, *Impact of C-Reactive Protein on Disease Risk and Its Relation to Dietary Factors*: Literature Review, 2007.

National Institute for Health and Clinical Excellence (2005) *Public Health Programme Guidance on Maternal and Child Health Nutrition* (draft). <http://www.nice.org.uk/page.aspx?MaternalandChild-NutritionMain>.

National Institute of Health: *Third Report of the National Cholesterol Educational Program Expert Panel on detection, evaluation, e treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) Executive Summary*. Bethesda, MD, National Institute of Health, National Heart, Lung e Blood Institute. 2005.

Nedwin GE, S L Naylor, A Y Sakaguchi, D Smith, J Jarrett-Nedwin, D Pennica, D V Goeddel, P W Gray. *Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization*. *Nucleic Acids Res*. 1985 September 11; 13(17): 6361–6373.PMCID: PMC321958.

Nell JV, Schull WJ. *Human Heredity*. Chicago: University of Chicago Press, 1954.

Neuhouser ML, Patterson RE, King IB, Horner NK, Lampe JW *Selected nutritional biomarkers predict diet quality*. Public Health Nutr. 2003 Oct;6(7):703

Nieters A, Becker N, Linseisen J (2002). *Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort*. Eur J Nutr 41, 210–221.

Nordoy A, Bonna KH, Sandset PM, Hansen JB, Nilsen H. *Effect of omega-3 fatty acids and simvastatin on hemostatic risk factors and post-prandial hyperlipidemia in patients with combined hyperlipidemia*. Arterioscler Thromb Vas Biol 2000;20:259-65.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR et al. *Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004*. JAMA 2006;295:1549–1555

Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon 3rd, R.O., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y., Myers, G.L., et al., (2003). *Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association*. Circulation 107, 499–511.

Pehrsson, P.R., D.B. Haytowitz, J.M. Holden, and C.R. Perry. 2000. *USDA's national food and nutrient analysis program: Food sampling*. Journal of Food Composition and Analysis 13:379–389.

Pepe S, Bogdanov K, Hallaq H, Spurgeon H, Leaf A, Lakatta E. *Omega 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type Ca⁺⁺ channels, cytosolic Ca⁺⁺, and contraction in adult rat cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:8832-6.

Pepys MB, Hirschfield GM. (2003). *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest; 111: 1805–12.

Pérusse L and Bouchard C. (2000). *Gene-diet interactions in obesity*. Am J Clin Nutr. 72(suppl):1285S–90S.

Pirmez, C., M. Yamamura, K. Uyemura, M. Paes-Oliveira, and R.L. Modlin (1993). *Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis*. J. Clin. Invest; 91:1390-1395

Plutzky J: *Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes*. Am J Cardiol 2001, 88:10K-15K.

Pokpo K, Górska E, Pyrzak B, Telmaszyk-Emmel A, Wisniewska A, Maicher A, Masik M, Demkow U, (2009). *Influence of proinflammatory cytokine gene polymorphism on childhood obesity*. Eur J Med Res 14 Suppl 4:59-62.

Polesel J, Dal Maso L, La Vecchia C, et al., *Dietary Folate, Alcohol Consumption, and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma*. Nutrition And Cancer, 2007; 57(2):146–150.

- Poli A. *Acidi grassi omega-3 e prevenzione cardiovascolare*. Trends Med 2002;2:129-36.
- PONTIERI G.M. et al., *Patologia Generale*, Piccin, 1996.
- Price P, Witt C, Alicock R, Sayer D, Garlepp M, Choy Kok C, French M, Malla S, Prank C. (1999). *The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases*. Immunohgical Reviews. Vol. 167:257-274.
- Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S et al. (1997). *Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells*. Diabetes 46, 1939–1944.
- Pryor W A (2000). *Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials*. Free Radic Biol Med, 28, 141-64.
- Qiu C, Sorensen TK, Luthy DA, Williams MA (2004) *A prospective study of maternal serum C-reactive protein (CRP) concentration and risk of gestational diabetes mellitus*. Paediatr Perinat Epidemiol 18:377–384.
- Ridker PM (2001). *High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease*. Circulation, 103, 1813-8.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N.(2000). *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. N Engl J Med; 342: 836–43.
- Ridker, P.M., Buring, J.E., Cook, N.R., Rifai, N., 2003. *C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy American women*. Circulation 107, 391–397.
- Roche HM, Gibney MJ. *Effect of fish oil fatty acids on fasting and post-prandial triacylglycerol metabolism*. Am J Clin Nutr 2000;71(Suppl 1):232S-37S
- Rohde LEP, Hennekens CH, Ridker PM. *Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men*. Am J Cardiol 1999; 84: 1018 – 1022.
- Romeo S, Sentinelli F, Capici F, Arca M, Berni A, Vecci E, Di Mario U, Baroni MG. *The G-308A variant of the Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) gene is not associated with obesity, insulin resistance and body fat distribution*. BMC Med Genet. 2001;2:10.
- Ross R. *Atherosclerosis-an inflammatory disease*. N Engl J Med 1999; 340: 115-26.
- Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C, Wilson PW. (2001). *Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study*. Stroke. 32(11):2575-9.
- Rustan AC, Nenaseter MS, Drevon CA. *Omega-3 and omega-6 fatty acids in the insulin resistance syndrome*. Ann NY Acad Sci 1997;827:310-26.

Sadeghipour HR, Rahnama A., Salesi M., Rahnama N., Mojtahedi H., *Relationship Between C-Reactive Protein and Physical Fitness, Physical Activity, Obesity and Selected Cardiovascular Risk Factors in Schoolchildren. 2010.*

Saynor R, Gillot T. *Changes in blood lipids and fibrinogen with a note on safety in a long term study on the effects of n-3 fatty acids in subjects receiving fish oil supplements and followed for seven years.* Lipids 1992; 27:533-8.

Scholl TO & Johnson WG (2000). *Folic acid: influence on the outcome of pregnancy.* Am J Clin Nutr 71, 1295S–1303S

Schreyer SA, Peschon JJ, LeBoeuf RC: *Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55.* J Biol Chem 1996, 271:26174-26178.

Selvin E, Paynter N P, Erlinger T P (2007). *The effect of weight loss on C-reactive protein: a systematic review.* Arch Intern Med, 167, 31-9.

Sheila F., Friedlander MD., Lawrence F., Eichenfield MD., Fowler MD., Richard G. Fried, MD, PhD, Moise L. Levy MD., and Guy F. Webster, MD, PhD, 2010. *Acne Epidemiology and Pathophysiology. Associations with body mass index.* J Clin Endocrinol Metab 95:263-270.

Shimokawa H, Vanhoutte PM. *Dietary omega-3 fatty acids and endothelium dependent relaxation in porcine coronary artery.* Am J Physiol 1989;256:H968-73.

Siega-Riz AM, Evenson KR, Dole N. *Pregnancy-related weight gain—A link to obesity?* Nutr Rev 2004;62(Suppl):S105–S111

Siega-Riz AM, Savitz DA, Zeisel SH, Thorp JM, Herring A. *Second trimester folate status and preterm birth.* Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1851–7.

Simopoulos A.P. (1991). *Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development.* Am. J. Clin. Nutr. 54:438–463.

Simopoulos AP. (2010). *Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk.* E.B.M. 235: 785–795.

Skoog, T., Dichtl, W., Boquist, S., Skoglund-Andersson, C., Karpe, F., Tang, R., Bond, M.G., de Faire, U., Nilsson, J., Eriksson, P., Hamsten, A., 2002. *Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men.* Eur. Heart J. 23, 376–383.

Sonmez K, Akcay A, Akcakoyun M, Demir D, Elonu OH, Pala S, Duran NE, Gencbay M, Degertekin M, Turan F: *Distribution of risk factors and prophylactic drug usage in Turkish patients with angiographically established coronary artery disease.* J Cardiovasc Risk 2002, 9:199-205.

Soyland E, Funk J, Rajka G, Sandberg M, Thune P, Rustad L, et al. *Dietary supplementation with very long chain n-3 fatty acids in patients with atopic dermatitis. A double blind, multicentre study.* Br J Dermatol 1994;130:757-64.

- Stryjecki C and DM Mutch *Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity*, 2011.
- Sullivan KE., Wooten C., Schmeckpeper BJ., Goldman D. and Petri MA., (1997). *A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans*. *Arthritis Rheum* 40:2207-2211.
- Superko HR. Beyond LDL cholesterol reduction. *Circulation* 1996; 94: 2351-4.
- Suzukawa M, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ. *Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidability, and uptake by macrophages*. *J Lipid Res* 1995;36:473-84.
- Szabò K., Tax G., Teodorescu-Brinzeu D., Koreck A. and Kemény L., (2010). *TNF α gene polymorphisms in the pathogenesis of acne vulgaris*. *Arch Dermatol Res* DOI 10.1007/s00403-010-1050-7.
- Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF: *Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences*. *Clin Sci* 1995, 88:485-459.
- Teufel NI (1997): *Development of culturally competent food-frequency questionnaires*. *Am J Clin Nutr.* 65, (4 Suppl), 1173S-1178S
- Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomized controlled trial*. *Lancet* 2003;361:477-85.
- Thomas DC. *Genetic epidemiology with a capital 'E'*. *Genet Epidemiol.* 19, 289-300 (2000).
- Thompson D, Pepys MB, Wood SP 1999 The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 7:169-177.
- Tilg H, Moschen AR. (2006). *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. *Nature* 6: 772-783.
- Tillett W S, Francis T (1930). *Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of the pneumococcus*. *J Exp Med*, 52, 561-71.
- Timpson N J, Lawlor D A, Harbord R M, et al (2005). *C-reactive protein and its role in metabolic syndrome: mendelian randomisation study*. *Lancet*, 366, 1954-9.
- Tonstad S., Cowan J. L. (2009). *C-reactive protein as a predictor of disease in smokers and former smokers: a review*. *Int J Clin Pract*, 63, 11, 1634-1641.
- Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V.(1998): *C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 18:1386-1392.
- Tòth E.K., Judit Kocsis, Balázs Madaras et al., (2007). *The 8.1 ancestral MHC haplotype is strongly associated with colorectal cancer risk*. *Int. J. Cancer*: 121, 1744-1748

Tòth E.K., Judit Kocsis, Balázs Madaras et al., (2007). *The 8.1 ancestral MHC haplotype is strongly associated with colorectal cancer risk*. Int. J. Cancer: 121, 1744–1748.

Trayhurn P, Wood IS (2004). *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr 92, 347–355.

Trujillo E, Davis C, Milner J. *Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics*. J Am Diet Assoc. 2006; 106: 403-413.

Um JY, Kang BK, Lee SH, Shin JY, Hong SH, Kim HM. *Polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene and waist-hip ratio in obese Korean women..* Mol Cells. 2004 Dec 31;18(3):340-5.

Verges B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F, Gambert P. *Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1364-9.

Vineis P, Kriebel D. *Causal models in epidemiology: past inheritance and genetic future*. Environmental Health: A Global Access Science Source 2006, 5:21.

Visser M, Bouter L M, McQuillan G M, et al (1999). *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults*. JAMA, 282, 2131-5.

Von Versen-Hoeynck Frauke, Carl A. Hubel, Marcia J. Gallaher, Hilary S. Gammill, Robert W. Powers; *Plasma levels of inflammatory markers neopterin, sialic acid and c-reactive protein in pregnancy and preeclampsia*, Am J Hypertens. 2009.

Vowels BR., Yang S. And Leyden JJ., (1995) *Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of Propionibacterium acnes: implications for chronic inflammatory acne*. Infect Immun 63:3158–3165.

Waldron-Lynch F., Adams C., Shanahan F., Molloy MG. and O’Gara F., (1999). *Genetic analysis of the 3’ untranslated region in rheumatoid arthritis affected and unaffected subjects*. J. Med Genet 36:214-216.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. *Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages*. Cytokine. 2000;12:1374–9.

Walston, J., Seibert, M., Yen, C.J., Cheskin, L.J., Andersen, R.E., 1999. *Tumor necrosis factor-alpha-238 and -308 polymorphisms do not associated with traits related to obesity and insulin resistance*. Diabetes 48, 2096–2098.

Wang B, Trayhurn P (2006). *Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture*. Pflugers Arch 452, 418–427.

Weber P, Raederstorff D. *Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC polyunsaturated fatty acids – a review*. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2000;10:28-37.

WHO Europe- The European Health Report 2005.

WHO Report: “*Healthy nutrition: the role of women*” 2000

Wijsman EM. Mendel's laws. In Elston R, Olsen J, Palmer L, eds. *Biostatistical Genetics and Genetic Epidemiology*. Chichester: Wiley, 2002: 527-29.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW (1997). *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci USA 94, 3195–3199.

Wirz SA, Morale MC, Marchetti B, Barr AM, Sotgiu S, Rosati G, Pugliatti M, Sanna MV, Giliberto O, Bartfai T, Conti B. (2004). *High frequency of TNF alleles -238A and -376A in individuals from northern Sardinia*. Cytokine. 21; 26(4):149-54.

Wolf M, Kettle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R (2001) *Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation*. Obstet Gynecol 98:757–762.

Wolf M, Sandler L, Hsu K, Vossen-Smirnakis K, Ecker JL, Thadhani R (2003) *First trimester C-reactive protein and subsequent gestational diabetes*. Diabetes Care 26:819–824.

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington: American Institute for Cancer Research; 1997.

World Health Organization (1995) *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry*. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series no. 854. Geneva: WHO.

World Health Organization. *HEALTH21: the health for all policy framework for the WHO European Region*. 1999

World Health Organization. *Standards for Maternal and Neonatal Care*. 2006

Zhao L.J, Dong-Hai Xiong, Feng Pan, Xiao-Gang Liu, Robert R. Recker, Hong-Wen Deng, (2008). *Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha receptor 2 gene are associated with obesity phenotypes among 405 Caucasian nuclear fam*.

8. APPENDICE

8.1 ALLEGATI

Allegato A



UNIVERSITA' DEGLI STUDI di CATANIA
Dipartimento di Anatomia, Biologia e Genetica, Medicina Legale,
Neuroscienze, Patologia Diagnostica, Igiene e Sanità Pubblica.

SORVEGLIANZA NUTRIZIONALE PER LA VALUTAZIONE DEI PROFILI DI RISCHIO DI UNA POPOLAZIONE SANA, IN ETÀ FERTILE O IN GRAVIDANZA

Numero identificativo: _____ Data:

ID richiesta: _____ ID intake: _____

Data di nascita (gg mm aa):

Altezzacm Peso attualeKg Peso pre-gestazionaleKg

Pressione arteriosa/.....mmHg P. a./.....mmHg P. a.
...../.....mmHg

1. Provenienza geografica

Italia (specificare regione).....

Esteri (specificare stato).....

2. Grado di istruzione conseguito

Lei	Partner	
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Nessuna
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Licenza elementare
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Licenza media
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Diploma
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Laurea

3. Professione

Lei	Partner	
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Imprenditore, dirigente, libero professionista
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Impiegato, tecnico, insegnante
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Commerciante, esercente, artigiano
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Operaio, commesso, bracciante, agricoltore
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Casalinga/o
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Pensionata/o
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Altro (specificare)

4. Condizione lavorativa

Full-time Part-time Disoccupata Economicamente inattiva*

* include studenti, casalinghe e disabili.

**La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori**

5. Ha delle intolleranze alimentari? **Si** **No** **Non so**

Se sì, qual è? _____

6. Segue restrizioni (esclusioni) dietetiche? **Si** **No**

Se è sì, indicare quali? _____

7. Lei mangia pasta? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (fresca, secca, integrale ...)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma? _____

8. Lei mangia riso? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (normale, integrale ...)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma? _____

9. Lei mangia cereali? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (integrali, al cioccolato, con frutta...)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma? _____

10. Lei mangia pistacchio? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... come abitualmente lo consuma (fresco, tostato, negli alimenti ...)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma? _____

11. Lei beve vino? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (bianco, rosso o rosato)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma? _____

12. Lei mangia uva? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (bianca o nera)?

13. Lei beve caffè? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (macinato, a chicchi,)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma?

14. Usa farina in cucina? **Si** **No**

Se lei ha risposto sì ... quale tipo abitualmente consuma (di semola, 00, ...)?

Se lei ha risposto sì ... quale marca commerciale abitualmente consuma?

**La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori**

15. È una fumatrice?

- Si** **No** **Ex-fumatrice**

Se sì, quante sigarette fuma al giorno? _____

16. E' in stato di gravidanza? **Si** **No** **Non so**

Se sì, qual è l'età gestazionale? _____ **settimane**

17. E' qui per un test di gravidanza? **Si** **No**

18. Abituamente programma la gravidanza? **Si** **No**

19. Usa integratori alimentari specifici per il periodo periconcezionale? **Si** **No**

Se sì, quale integratore usa? _____ Con quale dosaggio? _____

20. Usa integratori di acido folico? **Si** **No**

Se sì, quale integratore usa? _____ Con quale dosaggio? _____

21. Usa integratori multivitaminici e multiminerali? **Si** **No**

Se sì, quale integratore usa? _____ Con quale dosaggio? _____

22. Svolge abitualmente attività fisica/sportiva durante il tempo libero? **Si** **No**

Se sì, approssimativamente per quante ore in una settimana? _____

Allegato B

QUESTIONARIO DI FREQUENZA ALIMENTARE (FFQ, Food Frequency Questionnaire)

Segni la colonna che mostra quante volte, in media, lei mangia i seguenti alimenti.
Segni la grandezza delle sue abituali porzioni come piccola (P), normale (N), grande (G).

Una porzione piccola è mezza porzione media o meno.

Una porzione grande è una porzione e mezza rispetto a quella media o più.

CEREALI, PANE, SNACKS																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Cereali o barrette ai cereali	<input type="checkbox"/>	1 tazza o 1 barretta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Brioche confezionate	<input type="checkbox"/>	2 pezzi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Biscotti	<input type="checkbox"/>	4 pezzi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Biscotti integrali	<input type="checkbox"/>	4 pezzi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Pane bianco o Toast	<input type="checkbox"/>	1 panino o 100 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Pane integrale	<input type="checkbox"/>	1 panino o 100 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Fette biscottate o Crackers	<input type="checkbox"/>	4 fette o 1pacchetto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Fette biscottate o Crackers integrali	<input type="checkbox"/>	4 fette o 1pacchetto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Popcorn e salatini	<input type="checkbox"/>	1 pacco 100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Patate confezionate	<input type="checkbox"/>	1 pacco 100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Fruita secca sgusciata	<input type="checkbox"/>	1/2 tazza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Pistacchi	<input type="checkbox"/>	1/2 tazza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											

CARNE ROSSA, POLLO, PESCE, UOVA																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Uova	<input type="checkbox"/>	2 uova	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Bacon, Salame, Speck	<input type="checkbox"/>	3 fette	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Prosciutto cotto, crudo, bresaola, fesa	<input type="checkbox"/>	2 fette	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Wurstel	<input type="checkbox"/>	2 piccoli, 1 grande	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Mortadella	<input type="checkbox"/>	2 fette	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Carne di manzo, di vitello, di agnello	<input type="checkbox"/>	1 fetta o 100 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Carne di maiale	<input type="checkbox"/>	1 fetta o 100 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Carne di cavallo	<input type="checkbox"/>	1 fetta o 100 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Carne di pollo o di tacchino	<input type="checkbox"/>	1 fetta o 100 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Fegato o altri organi	<input type="checkbox"/>	60 gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Tonno in scatola	<input type="checkbox"/>	1 scatola piccola	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Pesce grasso: salmone, sgombro	<input type="checkbox"/>	100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Pesce semi-grasso: sardina, triglia, tonno, pesce spada	<input type="checkbox"/>	100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Pesce magro: sogliola, merluzzo, spigola, orata	<input type="checkbox"/>	100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Crostacei: aragosta, gambero	<input type="checkbox"/>	100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Molluschi: cozze, polpo, seppia	<input type="checkbox"/>	100gr	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											

La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori

PASTA, PIATTI MISTI, ZUPPA																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Pasta (totale)	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pasta asciutta	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pasta condita con	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pasta condita con	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pasta condita con	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Riso (totale)	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Riso bianco	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Riso condito con	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Riso condito con	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Riso condito con	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Legumi	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Minestrone	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pizza	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2 tranci	o	o	o

PRODOTTI CASEARI																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Formaggi	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	50 gr	o	o	o
Formaggi freschi	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	150 gr	o	o	o
Yogurt	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 vasetto	o	o	o

VEGETALI E CEREALI																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Segni tutti i vegetali che lei mangia, presenti anche nelle insalate, nei piatti misti e nei panini.																
Insalata verde	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Spinaci	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pomodori freschi	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Carote	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Peperoni	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Melanzane	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Cavolfiori, Broccoli	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Fagiolino	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Piselli	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Zucchine, zucca	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Verdura cotta	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Patate lesse e/o fritte	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Funghi	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Altro	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o

La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori

FRUTTA																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...	porzione media	P	N	G
Mela	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pera	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Banana	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Pesca, noce pesca o prugne	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Albicocche	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Arancia, mandarino	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Fragole o mirtilli	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Melone e mango	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Anguria	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Uva bianca	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Uva nera	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Ananas	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Ciliegie	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Altro	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Macedonia di frutta	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o

DOLCI																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Torte e pasticcini	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 fetta o 2 pezzi	o	o	o
Torte e pasticcini al pistacchio	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 fetta o 2 pezzi	o	o	o
Torte e pasticcini al caffè	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 fetta o 2 pezzi	o	o	o
Gelato	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 cono, 1 coppa media	o	o	o
Gelato al pistacchio	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 cono, 1 coppa media	o	o	o
Gelato al caffè	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 cono, 1 coppa media	o	o	o
Crema pasticcera o dolci molli	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione o 1 fetta	o	o	o
Cioccolato o snack al cioccolato	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione 30gr	o	o	o
Caramelle	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	4 pezzi	o	o	o

La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori

BEVANDE																
	Mai	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Acqua	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1,5 litro	o	o	o
Latte (tutti i tipi)	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 tazza	o	o	o
Succo d'arancia o di ananas	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchiere	o	o	o
Succo di frutta	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchiere	o	o	o
Succo d'uva	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchiere	o	o	o
Caffè	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 tazzina	o	o	o
Tea (tutti i tipi)	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchiere	o	o	o
Birra (tutti i tipi)	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	33 cl	o	o	o
Vino rosso	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchieri	o	o	o
Vino rose o bianco	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchieri	o	o	o
Liquori o altri drink	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchierino o 1 drink	o	o	o
Bibite gassate	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchiere	o	o	o
Altri alcolici	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 bicchiere	o	o	o

CONDIMENTI E SALSE																
	Mai o meno di 1 mese	1 al mese	2 al mese	3 al mese	1 a sett	2 a sett	3 a sett	4 a sett	5 a sett	6 a sett	1 al gg	2 o ...gg	porzione media	P	N	G
Olio d'oliva	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2 cucchiaini	o	o	o
Olio di semi	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2 cucchiaini	o	o	o
Aceto	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2 cucchiaini	o	o	o
Burro, Margarina	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1 porzione	o	o	o
Ketchup	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2 cucchiaini	o	o	o
Maionese	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	2 cucchiaini	o	o	o

Fig. 3: Schematizzazione dell'MHC

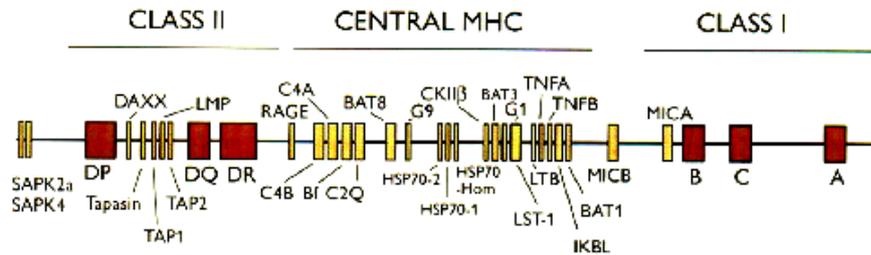


Fig. 4: Localizzazione del gene *TNF- α* .

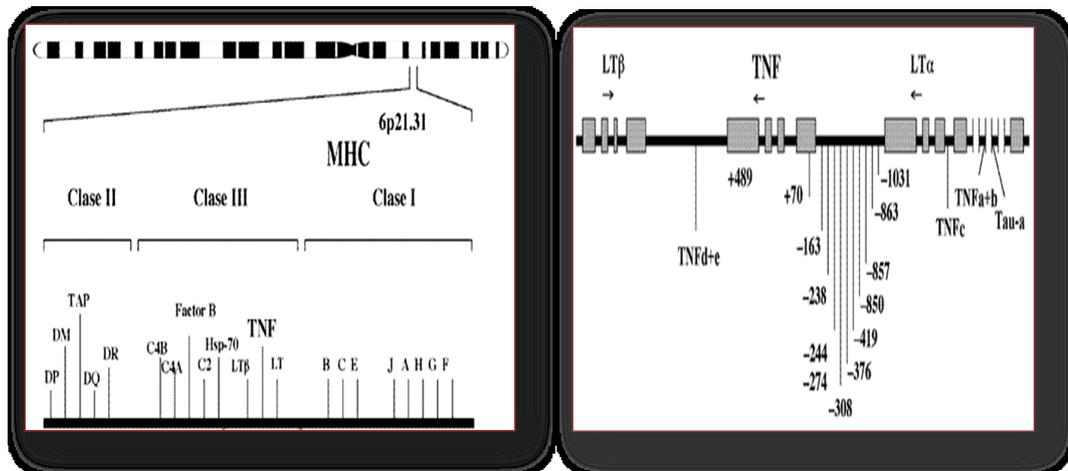


Fig. 5: Il tessuto adiposo e l'infiammazione

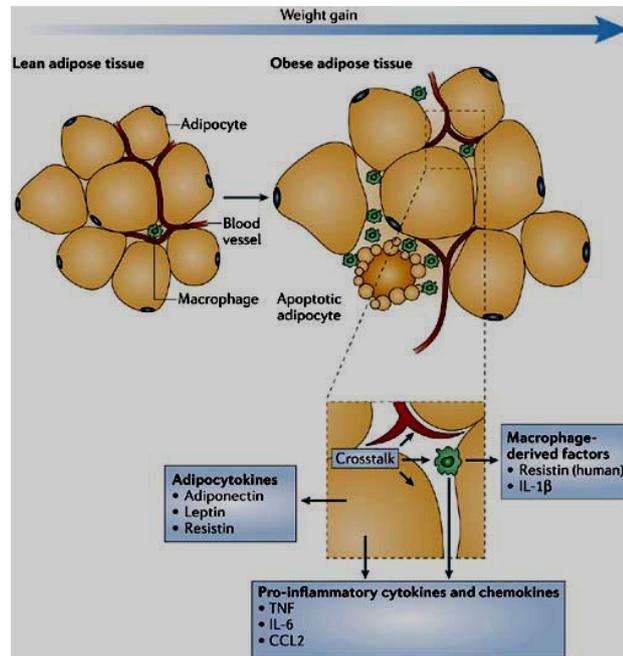
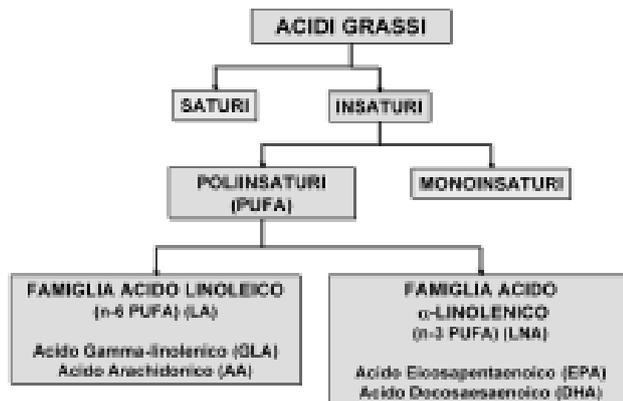


Fig. 6: Classificazione degli acidi grassi (Dei Cas, Nodari. Excerpta Medica 2003)



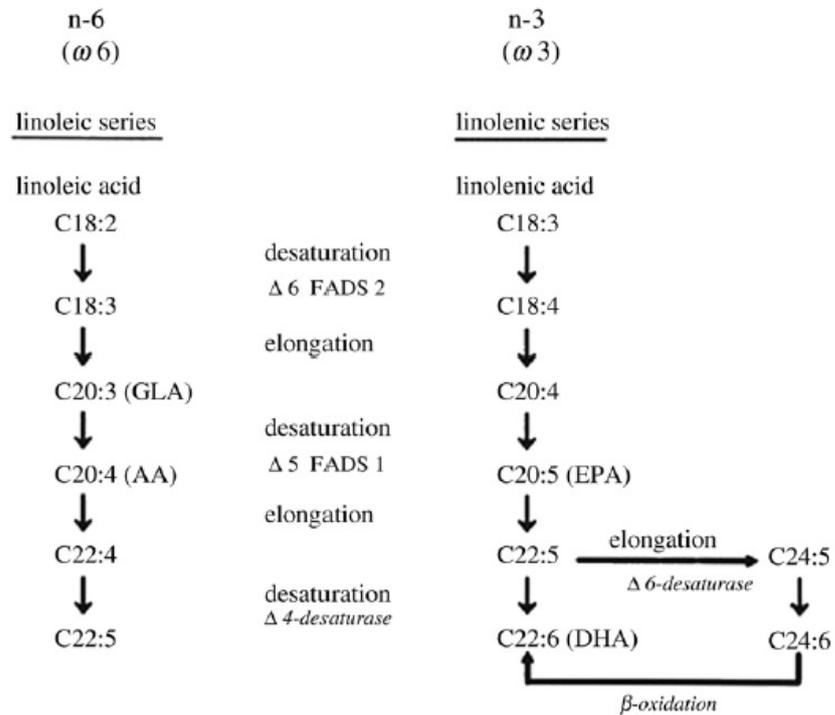
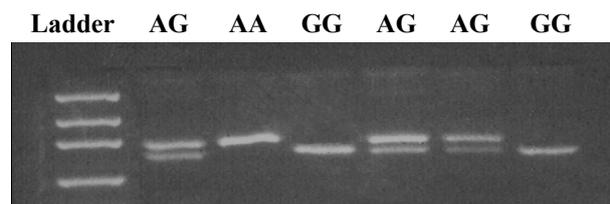


Figura 7: Corsa Elettroforetica con gel *NuSieve* al 5%



1^a Corsia: ***Ultra Low Range DNA ladder***;

2^a Corsia: **paziente con genotipo AG**; 3^a Corsia: **paziente con genotipo AA**;

4^a Corsia: **paziente con genotipo GG**; 5^a Corsia: **paziente con genotipo AG**;

6^a Corsia: **paziente con genotipo AG**; 7^a Corsia: **paziente con genotipo GG**.

9.3 TABELLE

Tab. 1: Immune-mediated diseases associated with the 8.1 AH

1. Addison's disease
2. Adult linear IGA disease
3. Alloimmune neonatal thrombocytopenia
4. Autoantibody-induced congenital heart block
5. Autoimmune hepatitis
6. Chronic bullous disease of childhood
7. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura
8. Common variable immunodeficiency
9. Dermatitis herpetiformis
10. Dermatomyositis
11. Dupuytren's disease
12. Gold salt toxicity
13. Grave's disease
14. HCV-related cryoglobulinemia
15. Herpes gestations
16. Idiopathic membranous nephropathy
17. IGA deficiency
18. Inclusion body myositis
19. Lambert–Eaton syndrome
20. Myasthenia gravis
21. Peyronie's disease
22. Polymyositis
23. Primary biliary cirrhosis
24. Primary sclerosis cholangitis
25. Sarcoidosis
26. Silicone-induced morphea
27. Sjögren's syndrome
28. Systemic lupus erythematosus

Tab. 2: Immunological alterations observed in healthy carriers of 8.1 AH

	Effects of the 8.1 AH
Autoantibodies	Increased
Antibody response to EBV, HBV, and influenza virus	Reduced
Blood-activated T cells	Increased
Blood immune complexes	Increased
Blood lymphocytes	Reduced
<i>In vitro</i> T cell activation	Reduced
Lymphocyte apoptosis	Increased
Macrophage function	Reduced
Natural killer activity	Reduced
Neutrophil chemotaxis	Reduced
T cell response to mitogens	Reduced
Type 1 cytokine production	Reduced
Type 2 cytokine production	Increased

Tab. 3: Effetti anti-trombotici dei PUFA n-3

Riduzione di fattori protrombotici	Aumento dei fattori antitrombotici
<ul style="list-style-type: none"> • Trombossano A₂ • Numero di piastrine • Adesione piastrinica • Aggregazione piastrinica • Fibrinogeno • Fattore di adesione piastrinica • Fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) • Lipoproteina (a) 	<ul style="list-style-type: none"> • Prostaciline I₂ • Fattore di rilasciamento endotelio-derivato (EDRF o NO) • Fibrinolisi • Tempo di emorragia

Tabella 4: Valori di riferimento dell'IMC proposti dal WHO per la valutazione dello stato nutrizionale nell'adulto (WHO, 1995 e 1998)

Classificazione	IMC
Sottopeso	< 18.5
Normopeso	18.5 – 24.9
Sovrappeso	25.0 – 29.9
Obesità	≥ 30.0

Tabella 4: Associazione tra la condizione socio-economica e lo stato di casalinga ($p < 0.001$)

	Casalinga	Non casalinga
Livello di istruzione: medio basso	75.2% (n= 185)	34.5% (n= 58)
Livello di istruzione: medio alto	24.8% (n= 61)	65.5% (n= 171)

Tabella 6: Abitudine al fumo di sigaretta

	Tutte le partecipanti
Fumatrici	28%
Non fumatrici	57.8%
Ex-fumatrici	14.2%

Tabella 7: Abitudine al fumo di sigaretta e stato di gravidanza delle donne

($p = 0.024$)

	Gravidanza	Non gravidanza
Fumatrici	48.3% (n= 56)	51.7% (n= 60)
Non fumatrici o ex fumatrici	60.5% (n= 181)	39.5% (n= 118)

Tabella 8: Abitudine al fumo di sigaretta e condizione socio-economica ($p = 0.005$)

	Casalinghe	Non casalinghe
Fumatrici	32.9% (n= 81)	20.4% (n= 34)
Non fumatrici	67.1% (n= 165)	79.6% (n= 133)

Tabella 9: Abitudine al fumo di sigaretta e livello di istruzione ($p = 0.004$)

	Livello di istruzione medio-basso	Livello di istruzione medio-alto
Fumatrici	33.5% (n= 81)	20.5% (n= 35)
Non fumatrici	66.5% (n= 161)	79.5% (n= 136)

Tabella 10: Stato nutrizionale della popolazione

	WHO
Sottopeso	10.1% (n= 42)
Normopeso	55.7% (n= 233)
Sovrappeso	19.4% (n= 81)
Obesità	14.8% (n= 62)

Tabella 11: Associazione tra stato nutrizionale della popolazione di donne ed età
divisa in percentili ($p < 0.001$)

	Sottopeso- normopeso	Sovrappeso- obese
entro il 25°percentile (fino a 23 anni)	33.5% (n= 92)	21% (n= 30)
dal 25° al 50°percentile (24-27 anni)	23.3% (n= 64)	16.8% (n= 24)
dal 50° al 75°percentile (28-32 anni)	22.9% (n= 63)	28.7% (n= 41)
dal 75° al 100° percentile (33- 52 anni)	20.4% (n= 56)	33.6% (n= 48)
Totale	100% (n= 275)	100% (n= 143)

Tabella 12: Media e deviazione standard dell'età della popolazione considerando lo
stato nutrizionale

	Sottopeso- normopeso	Sovrappeso- obese	<i>p</i> -value
Età	27.4 \pm 7.4	29.9 \pm 7.5	0.002

Tabella 13: Associazione tra stato nutrizionale della popolazione e mediana dell'età
($p < 0.001$)

	Età \leq 27 anni	Età $>$ 27 anni
Sovrappeso-obese	37.8%	62.2%
Sottopeso-normopeso	56.7%	43.3%

Tabella 14: Associazione tra stato nutrizionale ed etnia

	Razza caucasica	Razza non caucasica
Sottopeso/normopeso	98.2% (n= 270)	1.8% (n= 5)
Sovrappeso/obese	97.9% (n= 139)	2.1% (n= 3)

Tabella 15: Associazione tra stato nutrizionale e condizione socio-economica

	Donne sottopeso/normopeso	Donne sovrappeso/obese	<i>p</i>
Livello di istruzione medio-basso	54.4%	66.9%	0.014
Livello di istruzione medio-alto	45.6%	33.1%	
Casalinga	54.9%	68.5%	0.007
Non casalinga	45.1%	31.5%	

Tabella 16: Distribuzione dei genotipi del polimorfismo genetico *TNF- α* -308 G>A

	Frequenza genotipica (%)			Frequenza Allelica (%)	
	GG	AG	AA	G	A
TNFα-308 G>A	72.5% (n=303)	26.1% (n=109)	1.4% (n=6)	85.5%	14.5%

Tabella 17: Valori del Chi quadrato, del test G e delle probabilità associate per il

locus in studio

Parametro	Valore
Probabilità Chi quadrato (χ^2)	0,31
Probabilità test G	0,29
Eterozigosità osservata	0.26
Eterozigosità attesa	0.25
Indice di fissazione F	-0.052

Tabella 18: Associazione tra i genotipi del polimorfismo genetico *TNF- α* -308 G>A
e l'età

	entro il 25°percentile (fino a 23 anni)	dal 25° al 50°percentile (24-27 anni)	dal 50° al 75°percentile (28-32 anni)	dal 75° al 100° percentile (33- 52 anni)
Genotipo GG	72.2% (n= 88)	68.2% (n= 60)	76% (n= 79)	73.1% (n= 76)
Genotipo AG	26.2% (n= 32)	31.8% (n= 28)	24% (n=25)	23.1% (n= 24)
Genotipo AA	1.6% (n= 2)	0% (n= 0)	0% (n= 0)	3.8% (n= 4)

Tabella 19: Tavola di contingenza: genotipo AA o AG e suddivisione in percentili in
base all'età

	entro il 25°percentile (fino a 23 anni)	dal 25° al 50°percentile (24-27 anni)	dal 50° al 75°percentile (28-32 anni)	dal 75° al 100° percentile (33- 52 anni)
Genotipo AA+AG	27.9% (n=34)	31.8% (n=28)	24% (n=25)	26.9% (n=28)
Genotipo GG	72.1% (n=88)	68.2% (n=60)	76% (n=79)	73.1% (n=76)

Tabella 20: Frequenza dell'allele A incrociando il primo percentile con il secondo

	entro il 25°percentile (fino a 23 anni)	dal 25° al 50°percentile (24-27 anni)
Genotipo AA+AG	27.9% (n=34)	31.8% (n=28)
Genotipo GG	72.1% (n=88)	68.2% (n=60)

Tabella 21: Frequenza dell'allele A incrociando il primo percentile con il terzo

	entro il 25°percentile (fino a 23 anni)	dal 50° al 75°percentile (28-32 anni)
Genotipo AA+AG	27.9% (n=34)	24% (n=25)
Genotipo GG	72.1% (n=88)	76% (n=79)

Tabella 22: Frequenza dell'allele A incrociando il primo percentile con il quarto

	entro il 25°percentile (fino a 23 anni)	dal 75° al 100° percentile (33- 52 anni)
Genotipo AA+AG	27.9% (n=34)	26.9% (n=28)
Genotipo GG	72.1% (n=88)	73.1% (n=76)

Tabella 23: Frequenza dell'allele A incrociando il secondo percentile con il terzo

	dal 25° al 50°percentile (24-27 anni)	dal 50° al 75°percentile (28-32 anni)
Genotipo AA+AG	31.8% (n=28)	24% (n=25)
Genotipo GG	68.2% (n=60)	76%(n= 79)

Tabella 24: Frequenza dell'allele A incrociando il secondo percentile con il quarto

	dal 25° al 50°percentile (24-27 anni)	dal 75° al 100° percentile (33- 52 anni)
Genotipo AA+AG	31.8% (n=28)	26.9% (n=28)
Genotipo GG	68.2% (n=60)	73.1% (n=76)

Tabella 25: Frequenza dell'allele A incrociando il terzo percentile con il quarto

	dal 50° al 75°percentile (28-32 anni)	dal 75° al 100° percentile (33- 52 anni)
Genotipo AA+AG	24% (n=25)	26.9% (n=28)
Genotipo GG	76%(n= 79)	73.1% (n=76)

Tabella 26: Associazione tra genotipo e stato nutrizionale

26a: donne raggruppate in sottopeso/normopeso, sovrappeso/obese

	Genotipo AA + AG	Genotipo GG
Sottopeso/normopeso	61.7% (n= 71)	67.3% (n= 204)
Sovrappeso/obese	38.3% (n= 44)	32.7% (n= 99)

26b: donne raggruppate in obese e non obese

	Genotipo AA + AG	Genotipo GG
Non obese	80% (n= 92)	87.1% (n=264)
Obese	20% (n= 23)	12.9% (n= 39)

Tabella 27: Associazione tra donne non in gravidanza (n= 181) e stato nutrizionale

(obese e non obese) ($p= 0.011$; OR= 2.87, IC95%= 1.25 - 6.61)

	Genotipo AA+AG	Genotipo GG
Non obese	75% (n= 42)	89.6% (n= 112)
obese	25% (n= 14)	10.4% (n= 13)

Tabella 28: Media e deviazione standard del BMI dell'intera popolazione

	Genotipo AA+AG (n= 115)	Genotipo GG (n= 303)	P-value
BMI (Kg/m ²)	25 ± 6.1	24.1 ± 5.4	>0.05

Tabella 29: Media e deviazione standard del BMI delle donne non in gravidanza

	Genotipo AA+AG (n= 56)	Genotipo GG (n= 125)	P-value
BMI (Kg/m ²)	25.9 ± 6.2	24.1 ± 5.5	>0.05

Tabella 30: Associazione tra genotipo ed etnia

a)

	Etnia	
	Razza caucasica	Razza non caucasica
Genotipo <i>wild type</i> GG	72.4% (n= 296)	75% (n= 6)
Genotipo eterozigote AG	26.2% (n= 107)	25% (n= 2)
Genotipo mutato AA	1.5% (n= 6)	0% (n= 0)
Totale	100% (n= 409)	100% (n= 8)

b)

	Etnia	
	Razza caucasica	Razza non caucasica
Genotipo AA+ AG	27.6% (n= 113)	25% (n= 2)
Genotipo GG	72.4% (n= 296)	75% (n= 6)
Totale	100% (n= 409)	100% (n= 8)

Tabella 31: Media e deviazione standard dei parametri lipidici delle 204 donne

Parametro	Media e deviazione standard
Colesterolo HDL (mg/dL)	61.9 \pm 15.7
Colesterolo LDL (mg/dL)	116.4 \pm 42.19
Trigliceridi (mg/dL)	130 \pm 75.9
Colesterolo totale (mg/dL)	204 \pm 54.5
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3,43 \pm 1.12

Tabella 32: Media e deviazione standard dei parametri lipidici delle 204 donne
considerando lo stato di gravidanza

Parametro	Gravidanza	Non in gravidanza	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	70.9 \pm 16	52.2 \pm 11.6	< 0.001
Colesterolo LDL (mg/dL)	125.8 \pm 50.9	108.9 \pm 28.7	0.03
Trigliceridi (mg/dL)	157.5 \pm 85.8	89 \pm 42.5	< 0.001
Colesterolo totale (mg/dL)	227.3 \pm 61.5	178.9 \pm 32.6	< 0.001
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.73 \pm 1.28	3.26 \pm 0.97	0.15

Tabella 33: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nelle 204 donne
sovrappeso-obese e sottopeso-normopeso

Parametro	Sovrappeso-obeso	Sottopeso-normopeso	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	58.1 \pm 16.3	64 \pm 15	0.01
Colesterolo LDL(mg/dL)	122.2 \pm 46.2	113.2 \pm 39.6	0.14
Trigliceridi (mg/dL)	136.8 \pm 74.9	126.3 \pm 76.7	0.35
Colesterolo totale (mg/dL)	206.9 \pm 58.9	202.5 \pm 52	0.59
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.73 \pm 1.28	3.26 \pm 0.97	0.004

Tabella 34: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nelle 204 donne
obese e non obese

Parametro	Obese (n= 33)	Non Obese (n= 169)	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	57.9 \pm 17.1	62.7 \pm 15.4	0.112
Colesterolo LDL(mg/dL)	121.9 \pm 41.7	115.4 \pm 42.3	0.421
Colesterolo totale (mg/dL)	209.3 \pm 50.5	203.05 \pm 55.3	0.55
Trigliceridi (mg/dL)	147.4 \pm 62.3	126.7 \pm 78.1	0.15
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.9 \pm 1.6	3.3 \pm 0.94	0.004

Tabella 35: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nelle donne non in gravidanza suddivise in sovrappeso-obese e sottopeso-normopeso

Parametro	Sovrappeso-obeso	Sottopeso-normopeso	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	50.3 \pm 12.9	56.9 \pm 12.3	0.01
Colesterolo LDL(mg/dL)	113.4 \pm 34.5	104.1 \pm 31.4	0.19
Trigliceridi (mg/dL)	100.2 \pm 47.4	77.9 \pm 32.8	0.01
Colesterolo totale (mg/dL)	183.7 \pm 40	176.6 \pm 36.9	0.86
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.9 \pm 1.5	3.1 \pm 0.7	0.006

Tabella 36: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nelle donne non in gravidanza suddivise in obese e non obese

Parametro	Obese (n= 17)	Non Obese (n= 70)	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	50 \pm 15.6	54.9 \pm 12.3	0.16
Colesterolo LDL(mg/dL)	118.4 \pm 39.8	105.7 \pm 30.9	0.154
Colesterolo totale (mg/dL)	192.5 \pm 41.2	176.6 \pm 37.16	0.125
Trigliceridi (mg/dL)	120.3 \pm 42.2	79.8 \pm 37	<0.001
Colesterolo totale/colesterolo HDL	4.3 \pm 2.1	3.3 \pm 0.8	0.002

Tabella 37: Correlazione tra BMI (Kg/m²) e profilo lipidico (mg/dL) nelle 204
donne non in gravidanza

Variabili	Coefficiente r_p	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	-0.243	0.023
Colesterolo LDL (mg/dL)	0.148	0.2
Trigliceridi (mg/dL)	0.281	0.008
Colesterolo totale (mg/dL)	0.106	0.33
Colesterolo totale/colesterolo HDL	0.303	0.004

Tabella 38: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nelle donne con
genotipi AA+AG e GG

Parametro	AA+AG	GG	p value
Colesterolo HDL (mg/dL)	59.6 ± 13.1	63.4 ± 17.1	0.09
Colesterolo LDL (mg/dL)	112.2 ± 38.9	119.1 ± 44.1	0.26
Trigliceridi (mg/dL)	130 ± 71.4	130 ± 78.9	1
Colesterolo totale (mg/dL)	197.8 ± 50	207.9 ± 56.9	0.2
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.14 ± 0.97	3.48 ± 1.2	0,19

Tabella 39: Livelli di colesterolo HDL ed LDL in base allo stato nutrizionale e al
genotipo

a)

	Sottopeso- Normopeso AA+AG	Sottopeso- Normopeso GG	Sovrappeso- obeso AG + AA	Sovrappeso- obeso GG
Colesterolo HDL (mg/dl)	61.4 ± 12.26	65.6 ± 16.4	56.5 ± 14	59.2 ± 17.17
Colesterolo LDL (mg/dl)	110.18 ± 38.14	115.06 ± 40.58	115.6 ± 40.57	126.49 ± 49.48
Colesterolo Totale/colesterolo HDL	3.27 ± 0.91 (n= 49)	3.26 ± 1.0 (n= 81)	3.77 ± 1.43 (n= 43)	3.67 ± 1.05 (n= 29)

La variante G -308 A *TNF- α* quale fattore di rischio per l'obesità e modificatore
d'effetto del profilo lipidico e dei *marker* infiammatori

b)

	Obese AA+AG (n= 16)	Obese GG (n= 17)	Non obese AA+AG (n= 62)	Non obese GG (= 107)
Colesterolo HDL(mg/dl)	53.6 ± 14.6	62 ± 18.6	61.1 ± 12.3	63.6 ± 16.9
Colesterolo LDL(mg/dl)	112.18 ± 43	131.1 ± 39.4	112.2 ± 38.1	117.2 ± 44.6
Colesterolo Totale/colesterolo HDL	3.8 ± 1.2	4.02 ± 2	3.3 ± 0.9	3.34 ± 0.98

Tabella 40: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nella popolazione
considerando le donne non in gravidanza e il genotipo

Parametro	AA+AG	GG	P value
Colesterolo HDL (mg/dL)	56.4 ± 14.4	52.2 ± 11.6	0.14
Colesterolo LDL (mg/dL)	107.2 ± 38.3	108.9 ± 28.7	0.80
Trigliceridi (mg/dL)	85.9 ± 39.6	89 ± 42.5	0.73
Colesterolo totale (mg/dL)	180.7 ± 45.2	178.9 ± 32.6	0.83
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.3 ± 0.95	3.6 ± 1.4	0.26

Tabella 41: Media e deviazione standard dei parametri lipidici nella popolazione
considerando le donne in gravidanza e il genotipo

Parametro	AA+AG	GG	P value
Colesterolo HDL (mg/dL)	62.5 ± 11	70.9 ± 16	0.004
Colesterolo LDL (mg/dL)	116.7 ± 39.3	125.8 ± 50.93	0.32
Trigliceridi (mg/dL)	169.9 ± 70.5	157.5 ± 85.8	0.42
Colesterolo totale (mg/dL)	213.2 ± 49.6	227.3 ± 61.5	0.21
Colesterolo totale/colesterolo HDL	3.5 ± 0.99	3.3 ± 1	0.36

Tabella 42: Correlazione tra BMI (Kg/m²) e profilo lipidico (mg/dL) nelle 204
donne non in gravidanza aggiustando per genotipo

Parametro	AA+AG		GG	
	r_p	p	r_p	p
Colesterolo HDL (mg/dL)	-0.22	0.2	-0.313	0.027
Colesterolo LDL (mg/dL)	0.76	0.6	0.234	0.102
Colesterolo totale (mg/dL)	0.66	0.7	0.146	0.311
Trigliceridi (mg/dL)	0.42	0.01	0.197	0.171
Colesterolo totale/colesterolo HDL	0.33	0.049	0.329	0.019

Tabella 43: Distribuzione della proteina C-reattiva nella popolazione

	Frequenza	Percentuale
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	100	49.3%
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	103	50.7%
Dati mancanti	1	-
Totale	204	100.0%

Tabella 44: Associazione tra proteina C-reattiva e stato di gravidanza ($p < 0.001$)

	Donne in stato di gravidanza	Donne non in stato di gravidanza
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	31.6% (n= 37)	73.3% (n= 63)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	68.4% (n= 80)	26.7% (n= 23)

Tabella 45: Media e deviazione standard dei livelli di PCR in base allo stato di
gravidanza

Parametro	Donne in gravidanza	Donne non in gravidanza	P-value
PCR (mg/L)	6.4 \pm 7.5	2.6 \pm 3.4	<0.001

Tabella 46: Associazione tra proteina C-reattiva ed età ($p= 0.019$)

	Entro il 25° percentile (fino a 23 anni)	Dal 25° al 50° percentile (24-28 anni)	Dal 50° al 75° percentile (29-34 anni)	Dal 75° al 100° percentile (35-49 anni)
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	60.4% (n= 32)	38.9% (n= 21)	38% (n= 19)	60.9% (n= 28)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	39.6% (n= 21)	61.1% (n= 33)	62% (n= 31)	39.1% (n= 18)

Tabella 47: Associazione tra PCR, età nelle donne in gravidanza (n= 117)

	Entro il 25° percentile (fino a 23 anni)	Dal 25° al 50° percentile (24-28 anni)	Dal 50° al 75° percentile (29-34 anni)	Dal 75° al 100° percentile (35-49 anni)
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	40% (n= 12)	31% (n= 13)	27.3% (n= 9)	25% (n= 3)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	60% (n= 18)	69% (n= 29)	72.7% (n= 24)	75% (n= 9)

Tabella 48: Associazione tra PCR, età nelle donne non in gravidanza (n= 86)

	Entro il 25° percentile (fino a 23 anni)	Dal 25° al 50° percentile (24-28 anni)	Dal 50° al 75° percentile (29-34 anni)	Dal 75° al 100° percentile (35-49 anni)
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	87% (n= 20)	66.7% (n= 8)	58.8% (n= 10)	73.5% (n= 25)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	13% (n= 3)	33.3% (n= 4)	41.2% (n= 7)	26.5% (n= 9)

Tabella 49: Associazione tra proteina C- reattiva e genotipi

	Genotipo AG+AA	Genotipo GG
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	50.6% (n=39)	48.4% (n=61)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	49.4% (n= 38)	51.6% (n= 65)

Tabella 50: Associazione tra genotipo, età nelle donne con livelli plasmatici di PCR
 ≤ 3 mg/L (n= 100)

	Entro il 25° percentile (fino a 23 anni)	Dal 25° al 50° percentile (24-28 anni)	Dal 50° al 75° percentile (29-34 anni)	Dal 75° al 100° percentile (35-49 anni)
Genotipo AA+AG	46.9% (n= 15)	28.6% (n= 6)	47.4% (n= 9)	32.1% (n= 9)
Genotipo GG	53.1% (n= 17)	71.4% (n= 15)	52.6% (n= 10)	67.9% (n= 19)

Tabella 51: Associazione tra genotipo, età nelle donne con livelli plasmatici di PCR
 ≥ 3 mg/L (n= 104)

	Entro il 25° percentile (fino a 23 anni)	Dal 25° al 50° percentile (24-28 anni)	Dal 50° al 75° percentile (29-34 anni)	Dal 75° al 100° percentile (35-49 anni)
Genotipo AA+AG	42.9% (n= 9)	32.4% (n= 11)	32.3% (n= 10)	50% (n= 9)
Genotipo GG	57.1% (n= 12)	67.6% (n= 23)	67.7% (n= 21)	50% (n= 9)

Tabella 52: Associazione tra PCR, genotipo considerando le donne in gravidanza
(n= 117)

	Genotipo AA+AG	Genotipo GG
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	31.7% (n= 13)	31.6% (n= 24)
Livelli plasmatici di PCR ≥ 3 mg/L	68.3% (n= 28)	68.4% (n= 52)

Tabella 53: Associazione tra PCR, genotipo considerando le donne non in gravidanza (n= 86)

	Genotipo AA+AG	Genotipo GG
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	72.2% (n= 26)	74% (n= 37)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	27.8% (n= 10)	26% (n= 13)

Tabella 54: Media e deviazione standard dei livelli di PCR in base al genotipo in tutta la popolazione di 204 donne

Parametro	Genotipo AA+AG	Genotipo GG	p-value
PCR (mg/L)	5.4 \pm 7.8	4.5 \pm 5.4	0.34

Tabella 55: Media e deviazione standard dei livelli di PCR in base al genotipo solo nelle donne in gravidanza

Parametro	Genotipo AA+AG	Genotipo GG	p-value
PCR (mg/L)	7.3 \pm 9.7	5.9 \pm 6.1	0.37

Tabella 56: Media e deviazione standard dei livelli di PCR in base al genotipo tra donne non in gravidanza

Parametro	Genotipo AA+AG	Genotipo GG	p-value
PCR (mg/L)	3.2 \pm 4.2	2.2 \pm 3	0.22

Tabella 57: Analisi bivariata tra PCR e stato nutrizionale solo nelle donne non in gravidanza (n= 86) ($p= 0.001$)

	Sovrappeso/obeso	Sottopeso/normopeso
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	55.3% (n= 21)	87.5% (n= 42)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	44.7% (n= 17)	12.5% (n= 6)

Tabella 58: Media e deviazione standard dei livelli di PCR in base allo stato nutrizionale solo nelle donne non in gravidanza

Parametro	Sovrappeso/obeso	Sottopeso/normopeso	p-value
PCR (mg/L)	4.097 \pm 4.41	1.48 \pm 2.2	0.001

Tabella 59: Analisi bivariata tra proteina C-reattiva e stato nutrizionale, solo nelle donne non in gravidanza, stratificando per il genotipo GG (n= 50) ($p= 0.008$)

	Sovrappeso/obeso	Sottopeso/normopeso
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	59.1% (n= 13)	85.7% (n= 24)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	40.9% (n= 9)	14.3% (n= 4)

Tabella 60: Analisi bivariata tra proteina C-reattiva e stato nutrizionale, solo nelle donne non in gravidanza, stratificando per genotipo AG+AA (n= 36) ($p= 0.03$)

	Sovrappeso/obeso	Sottopeso/normopeso
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	50% (n=8)	90% (n=18)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	50% (n=8)	10% (n=2)

Tabella 61: Analisi bivariata tra PCR e stato nutrizionale (obese e non obese) solo
nelle donne non in gravidanza (n= 86) ($p < 0.001$)

	Obese	Non obese
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	35.3% (n= 6)	82.6% (n= 57)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	64.7% (n= 11)	17.4% (n= 12)

Tabella 62: Analisi bivariata tra proteina C-reattiva e stato nutrizionale (obese e non
obese), solo nelle donne non in gravidanza, stratificando per il genotipo GG (n= 50)
($p = 0.003$)

	Obese	Non obese
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	28.6% (n= 2)	81.4% (n= 35)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	71.4% (n= 5)	18.6% (n= 8)

Tabella 63: Analisi bivariata tra proteina C-reattiva e stato nutrizionale (obese e non
obese) solo nelle donne non in gravidanza, stratificando per il genotipo AG
($p = 0.007$)

	Obese	Non obese
Livelli plasmatici di PCR < 3 mg/L	40% (n= 4)	84.6% (n= 22)
Livelli plasmatici di PCR \geq 3 mg/L	60% (n= 6)	15.4% (n= 4)

Tabella 64: Correlazione tra i livelli plasmatici di PCR e profilo lipidico delle donne
non in gravidanza (n= 86)

Variabili	Coefficiente r_p	<i>p</i> value
Colesterolo HDL (mg/dL)	-0.039	0.72
Colesterolo LDL (mg/dL)	0.139	0.201
Colesterolo totale (mg/dL)	0.161	0.139
Trigliceridi (mg/dL)	0.254	0.018
Colesterolo totale/colesterolo HDL	0.114	0.298
BMI (Kg/m ²)	0.588	<0.001
Età (anni)	0.132	0.224

Tabella 65: Correlazione tra i livelli plasmatici di PCR e profilo lipidico delle donne
non in gravidanza aggiustate in base al genotipo

Parametro	AA+AG (n= 36)		GG (n= 50)	
	r_p	<i>p</i>	r_p	<i>p</i>
Colesterolo HDL (mg/dL)	-0.61	0.724	-0.062	0.671
Colesterolo LDL (mg/dL)	0.73	0.671	0.243	0.089
Colesterolo totale (mg/dL)	0.115	0.505	0.223	0.119
Trigliceridi (mg/dL)	0.421	0.011	0.121	0.403
Colesterolo totale/colesterolo HDL	0.183	0.286	0.108	0.454
BMI (Kg/m ²)	0.733	<0.001	0.430	0.002
Età (anni)	0.249	0.143	0.047	0.744

Tabella 66: Distribuzione del polimorfismo -308 G>A nelle 214 donne

	Frequenza	Percentuale
GG	177	82,7
AG	36	16,8
AA	1	0,5

Tabella 67: Stato nutrizionale delle 214 donne

	Frequenza (n)	Percentuale
Sottopeso	24	11.2%
Normopeso	121	56.5%
Sovrappeso	40	18.7%
Obese	29	13.6%
Totale	214	100%

Tabella 68: Associazione tra genotipo e stato nutrizionale nelle 214 donne

a)

	Genotipo AA+AG	Genotipo GG
Sovrappeso/obese	40.5% (n= 15)	30.5% (n= 54)
Sottopeso/normopeso	59.5% (n= 22)	69.5% (n= 123)

b)

	Genotipo AA+AG	Genotipo GG
Obese	18.9% (n= 7)	12.4% (n= 22)
Non obese	81.1% (n= 30)	87.6% (n= 155)

Tabella 69 : Caratteristiche della popolazione in relazione allo stato nutrizionale:
differenza tra medie e deviazione standard

Assunzione media giornaliera (gr)	Sottopeso/normopeso (n= 145)	Sovrappeso/obeso (n= 69)	<i>p</i>
SFA: Acidi grassi saturi	34,8 ± 17,6	29,6 ± 16,4	0,038
Acidi insaturi	148,3 ± 277,3	86,7 ± 90,04	0,073
PUFA Totali: Acidi grassi poliinsaturi	19,6 ± 9,7	15,9 ± 11,4	0,013
IMUFA	128,7 ± 274,6	70,8 ± 85,9	0,089
LA: Ac. linoleico (C18:2 n-6 PUFA)	18 ± 11	14 ± 10,7	0,013
AA: Ac. arachidonico (C20:4 n-6 PUFA)	0,2 ± 0,3	0,13 ± 0,06	0,26
GLA: Ac. γ-linoleico (C18:3 n-6 PUFA)	1,7 ± 1,02	1,3 ± 0,64	0,013
ALA: Ac. A-linolenico (C18:3 n-3 PUFA)	1,7 ± 1,02	1,3 ± 0,6	0,015
EPA: Ac. eicosapentaenoico (C20:5 n-3 PUFA)	0,13 ± 0,24	0,09 ± ,075	0,23
DHA: Ac. docosaesaenoico (C22:6 n-3 PUFA)	0,31 ± 0,76	0,21 ± 0,13	0,31
PA: Acido palmitico	19,9 ± 12,5	16,6 ± 8,8	0,051
Ac. Insaturi / Ac. Saturi	3,9 ± 5,6	2,9 ± 2,4	0,17

Tabella 70 : Caratteristiche della popolazione in relazione allo stato di gravidanza:

differenza tra medie e deviazione standard

Assunzione media giornaliera (gr)	Donne in gravidanza (n= 120)	Donne non in gravidanza (n= 91)	<i>p</i>
SFA: Acidi grassi saturi	33.34 \pm 16.6	33.22 \pm 18.7	0.96
Acidi insaturi	143.8 \pm 281.6	110.68 \pm 159.7	0.31
PUFA Totali: Acidi grassi poliinsaturi	17.7 \pm 9.4	19.5 \pm 11.7	0.21
MUFA	126.1 \pm 278.4	91.1 \pm 156.8	0.28
LA: Ac. linoleico (C18:2 n-6 PUFA)	15.8 \pm 8.8	18.01 \pm 13.5	0.16
AA: Ac. arachidonico (C20:4 n-6 PUFA)	0.15 \pm 0.07	0.19 \pm 0.4	0.34
GLA: Ac. gamma-linoleico (C18:3 n-6 PUFA)	1.6 \pm 0.7	1.61 \pm 1.17	0.66
ALA: Ac. A-linolenico (C18:3 n-3 PUFA)	1.5 \pm 0.7	1.6 \pm 1.2	0.71
EPA: Ac. eicosapentaenoico (C20:5 n-3 PUFA)	0.10 \pm 0.09	0.13 \pm 0.3	0.37
DHA: Ac. docosaesaenoico (C22:6 n-3 PUFA)	0.24 \pm 0.15	0.33 \pm 0.95	0.32
PA: Acido palmitico	18.4 \pm 8.5	19.7 \pm 14.7	0.44
Ac. Insaturi / Ac. Saturi	3.9 \pm 5.7	3.2 \pm 3.5	0.33

Tabella 71 : Caratteristiche della popolazione in relazione al genotipo

(AA+AG, GG): differenza tra medie e deviazione standard

Assunzione media giornaliera (gr)	AA+AG (n= 37)	GG (n= 177)	<i>p</i>
SFA: Acidi grassi saturi	29.9 ± 16	33.83 ± 17.7	0.21
Acidi insaturi	149 ± 247.7	124.1 ± 233.3	0.56
PUFA Totali: Acidi grassi poliinsaturi	17.5 ± 8.9	18.6 ± 10.7	0.54
MUFA	131.5 ± 246.1	105.5 ± 230.1	0.54
LA: Ac. linoleico (C18:2 n-6 PUFA)	15.6 ± 8.1	16.9 ± 11.6	0.5
AA: Ac. arachidonico (C20:4 n-6 PUFA)	0.15 ± 0.07	0.16 ± 0.3	0.7
GLA: Ac. gamma-linoleico (C18:3 n-6 PUFA)	1.4 ± 0.6	1.6 ± 1	0.2
ALA: Ac. A-linolenico (C18:3 n-3 PUFA)	1.4 ± 0.6	1.6 ± 1	0.22
EPA: Ac. eicosapentaenoico (C20:5 n-3 PUFA)	0.10 ± 0.1	0.12 ± 0.22	0.7
DHA: Ac. docosaesaenoico (C22:6 n-3 PUFA)	0.25 ± 1.17	0.3 ± 0.7	0.8
PA: Acido palmitico	17 ± 9	19.2 ± 12	0.3
Ac. Insaturi / Ac. Saturi	4.9 ± 7.2	3.3 ± 4.1	0.72

Tabella 72 : Caratteristiche della popolazione con genotipo GG (n= 177) in relazione
allo stato nutrizionale, differenza tra medie e deviazione standard

Assunzione media giornaliera (gr)	Sottopeso/normopeso (n= 15)	Sovrappeso/obeso (n= 22)	<i>p</i>
SFA: Acidi grassi saturi	35,75 \pm 18	29,4658 \pm 16,2	0,03
Acidi insaturi	145 \pm 274,6	76,6 \pm 61,6	0,07
PUFA Totali: Acidi grassi poliinsaturi	20 \pm 9,9	15,4 \pm 11,8	0,008
MUFA	125 \pm 271,6	61,2 \pm 55,9	0,09
LA: Ac. linoleico (C18:2 n-6 PUFA)	18,4 \pm 11,5	13,5 \pm 11,1	0,009
AA: Ac. arachidonico (C20:4 n-6 PUFA)	0,2 \pm 0,35	0,13 \pm 0,07	0,28
GLA: Ac. gamma-linoleico (C18:3 n-6 PUFA)	1,7 \pm 1,07	1,35 \pm 0,63	0,015
ALA: Ac. A-linolenico (C18:3 n-3 PUFA)	1,71 \pm 1,07	1,34 \pm 0,57	0,02
EPA: Ac. eicosapentaenoico (C20:5 n-3 PUFA)	0,13 \pm 0,26	0,09 \pm 0,07	0,23
DHA: Ac. docosaesaenoico (C22:6 n-3 PUFA)	0,32 \pm 0,83	0,20 \pm 0,11	0,32
PA: Acido palmitico	20,44 \pm 13	16,5 \pm 8,8	0,04
Ac. Insaturi / Ac. Saturi	3,6 \pm 4,7	2,7 \pm 2,05	0,19

Tabella 73 : Caratteristiche della popolazione con genotipo AA+AG, (n= 37) in
relazione allo stato nutrizionale: differenza tra medie e deviazione standard

Assunzione media giornaliera (gr)	Sottopeso/normopeso (n= 15)	Sovrappeso/obeso (n= 22)	<i>p</i>
SFA: Acidi grassi saturi	29,8 ± 14,96	29,9 ± 17,97	0,98
Acidi insaturi	166,8 ± 298,2	122,9 ± 152,45	0,6
PUFA Totali: Acidi grassi poliinsaturi	17,46 ± 8,2	17,45 ± 10,1	0,9
MUFA	149,3 ± 296,8	105,45 ± 149,66	0,6
LA: Ac. linoleico (C18:2 n-6 PUFA)	15,55 ± 7,4	15,57 ± 9,4	0,99
AA: Ac. arachidonico (C20:4 n-6 PUFA)	0,153 ± 0,085	0,147 ± 0,06	0,79
GLA: Ac. gamma-linoleico (C18:3 n-6 PUFA)	1,4 ± 0,61	1,35 ± 0,69	0,76
ALA: Ac. A-linolenico (C18:3 n-3 PUFA)	1,42 ± 0,60	1,36 ± 0,7	0,8
EPA: Ac. eicosapentaenoico (C20:5 n-3 PUFA)	0,104 ± 0,08	0,103 ± 0,85	0,98
DHA: Ac. docosaesaenoico (C22:6 n-3 PUFA)	0,258 ± 0,165	0,248 ± 0,176	0,86
PA: Acido palmitico	17,03 ± 9,1	17,09 ± 9,2	0,98
Ac. Insaturi / Ac. Saturi	5,66 ± 8,97	3,77 ± 3,32	0,44

Tabella 74: Correlazione del BMI (Kg/m²) con acidi grassi (gr) nelle 214 donne

Variabili	Coefficiente r_p	p value
Acidi grassi saturi	-0.216	0.014
Acidi grassi insaturi	-0.178	0.009
PUFA totali	-0.207	0.002
MUFA	-0.171	0.012

Tabella 75: Correlazione del BMI (Kg/m²) con acidi grassi (gr) nelle donne in
sottopeso o normopeso

Variabili	Coefficiente r_p	p value
Acidi grassi saturi	-0.235	0.004
Acidi grassi insaturi	-0.212	0.01
PUFA totali	-0.235	0.005
MUFA	-0.206	0.013

Tabella 76: Correlazione del BMI (Kg/m²) con acidi grassi (gr) considerando le
donne non in gravidanza (n= 94)

Variabili	Coefficiente r_s	p value
Acidi grassi saturi	-0.197	0.57
Acidi grassi insaturi	-0.266	0.010
PUFA totali	-0.252	0.014
MUFA	-0.222	0.032

Tabelle 77: Correlazione del BMI (Kg/m²) con acidi grassi (gr) considerando le
donne non in gravidanza e sottopeso/normopeso (n= 62)

Variabili	Coefficiente r_s	<i>p value</i>
Acidi grassi saturi	-0.299	0.018
Acidi grassi insaturi	-0.266	0.037
PUFA totali	-0.267	0.036
MUFA	-0.229	0.073