



FoRi SID onlus

## **Genetica, fisiopatologia ed evoluzione dell'alterata omeostasi del glucosio (IGR) verso diabete di tipo 2**

---

*Protocollo di studio*

✿ Rel 04/12.03.2002

## **Struttura dello studio**

---

### **Coordinatore Progetto di Ricerca FoRiSID-OnLus**

R. Giorgino  
c/o SID - Via G. Severano, 5; Roma - 06-44240967-44292060

### **Comitato Scientifico**

S. Del Prato (Pisa) , F. Beguinot (Napoli), R.C. Bonadonna (Verona), E. Bonora (Verona)  
A. Consoli (Chieti), A. Giaccari (Roma), F. Giorgino (Bari), G. Paolisso (Napoli)

### **Centri**

Bari (F. Giorgino)  
Cagliari (E. Cossu)  
Carrara (R. Trifirò)  
Chieti (A. Consoli)  
Ferrara (Fellin)  
Livorno (D. Barbaro)  
Milano (L. Luzi)  
Padova (A. Tiengo)  
Palermo (D. Sinagra)  
Parma (R. Lugari)  
Perugia (G. Bolli)  
Pisa (S. Del Prato)  
Pistoia (R. Anichini)  
Ravenna (F. Cannatà)  
Roma (A. Giaccari)  
Roma (P. Sbraccia)  
Reggio Emilia (D. Pierfranceschi)  
Sesto S. Givani (M. Rocco)  
Siena (I. Tanganelli)  
Torino (M. Trovati)  
Verona (R. Bonadonna)

**Segreteria Organizzativa**

R. Miccoli, G. Penno  
Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo,  
Ortopedia e Traumatologia, Medicina del Lavoro  
Sezione Metabolismo  
Ospedale di Cisanello  
Via Paradisa 2  
56100 PISA  
050-995136/137  
rmiccoli@immr.med.unipi.it

## INDICE

### Organizzazione dello Studio

1. Razionale della Ricerca .....	1
2. Obiettivi dello Studio .....	9
3. Tipologia e Numero dei Soggetti .....	10
4. Disegno Sperimentale .....	12
5. Procedure dello Studio .....	15
6. Eventi da segnalare .....	19
7. Interruzioni Premature .....	19
8. Statistica .....	20
9. Aspetti Etici .....	22
10. Emendamenti al Protocollo .....	23
11. Finanziamento dello Studio .....	23
<b>Bibliografia</b> .....	24
<b>Allegati</b> .....	28

## 1. RAZIONALE DELLA RICERCA

Il diabete mellito tipo 2 interessa un rilevante numero di individui di differenti origini etniche, di diversa estrazione sociale ed economica del mondo intero. Attualmente almeno 120 milioni di soggetti soffrono di diabete tipo 2, ma per l'anno 2010 è stimato che almeno 220 milioni di individui saranno affetti da questa patologia (1). Ci sono quindi tutte le condizioni per attendersi nella prossima decade una straordinaria diffusione dell'epidemia di diabete di tipo 2 (1). Il diabete e le relative complicanze diventeranno uno dei maggiori problemi per le risorse sanitarie pubbliche a livello mondiale per quanto concerne i costi economici e sociali, in particolare nei paesi in via di sviluppo (2). Questo non esclude che anche nelle nazioni occidentali si verificherà un incremento di prevalenza del diabete. L'Italia presenta la popolazione più anziana tra tutti i paesi dell'Europa, ed è noto che la longevità comporta un incremento del numero di individui che sviluppano il diabete. D'altra parte, l'aumento di prevalenza dell'obesità nella fascia di età più giovane contribuisce all'incremento del numero di soggetti con diabete tipo 2 e concorre ad allargare l'intervallo d'età interessato.

Nei confronti di tale epidemia, le modifiche alla classificazione del diabete proposte dall'American Diabetes Association (ADA) (3) e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (4), potrebbero avere importanti implicazioni. I cambiamenti più innovativi riguardano lo spostamento dell'attenzione per la diagnosi di diabete, dalla glicemia dopo carico di glucosio a quella a digiuno. Sia l'ADA che l'OMS hanno adottato gli stessi criteri per la definizione dell'Alterata Glicemia a Digiuno (IFG, 110-125 mg/dl) per quanto numerosi studi abbiano dimostrato che gli individui identificati sulla base di tale criterio non necessariamente sono gli stessi che presentano Ridotta Tolleranza Glucidica (IGT) (5, 6). L'Alterata Regolazione del Glucosio (IGR: IGT e IFG) indica una condizione intermedia tra la normale omeostasi glucidica ed il diabete. L'IGT oltre ad essere una categoria della precedente classificazione, viene

indicata come una fase della storia naturale del disordine del metabolismo glucidico. Accanto a questa, è stata individuata anche la categoria di IFG dal momento che questi soggetti, alla stregua di quelli con IGT (3,4), mostrano un elevato rischio di progressione verso il diabete e verso le complicanze macrovascolari. Sebbene gli studi prospettici siano pochi, i dati disponibili suggeriscono un rischio di progressione verso il diabete inferiore a quello dei soggetti con IGT (7), nonostante un profilo di rischio cardiovascolare comparabile (8). IGT e IFG non costituiscono entità cliniche di per sé, ma piuttosto fasi dello sviluppo di diabete e/o malattia cardiovascolare (9,10). L'IGR è spesso associata alla Sindrome Metabolica (Sindrome da Insulino-Resistenza) (11). L'IGR può non essere direttamente coinvolta nella patogenesi della malattia cardiovascolare, ma piuttosto può servire come marcatore di rischio in base alle correlazioni con gli elementi della Sindrome Metabolica di per sé riconosciuti come fattori di rischio cardiovascolare. In sintesi, è possibile identificare diverse categorie caratterizzate da iniziali disturbi della regolazione glucidica: normale glicemia a digiuno e normale tolleranza glucidica (NFG/NGT); IFG isolata ma con normale glicemia dopo carico (IFG/NGT); IGT isolata ma con normale glicemia a digiuno (NFG/IGT), e la combinazione delle due alterazioni (IFG/IGT).

Sebbene esistano sostanziali evidenze che l'obesità, la ridotta azione insulinica e la disfunzione della secrezione insulinica siano presenti nella maggior parte degli individui prima dell'insorgenza del diabete, la sequenza con cui esse si sviluppano ed il loro relativo contributo alla progressione dalla NGT all'IGR, ed infine al diabete tipo 2 (12-14), non può essere definita in assenza di studi longitudinali dettagliati (15-20). Le attuali conoscenze circa la patogenesi del diabete tipo 2 si fondano su numerosi studi trasversali (21-33) e prospettici (33-48). Negli studi trasversali, i soggetti con IGT presentano maggiore prevalenza di obesità e insulino-resistenza rispetto a quelli con NGT. La produzione endogena basale di glucosio (EGO), che riflette in gran parte la produzione epatica di glucosio, non risulta aumentata (49,15,16,21-23). Appare

controverso se negli individui con IGT la secrezione insulinica sia ridotta. Alcuni studi hanno dimostrato una ridotta risposta secretoria precoce (quale si verifica entro pochi minuti dopo un carico endovenoso di glucosio) nei soggetti con IGT rispetto a quelli con NGT (24-27). Una ridotta risposta insulinica secretoria è stata anche dimostrata nei familiari di primo grado di individui con diabete tipo 2, una popolazione ad alto rischio di sviluppare diabete (28-30). Altri autori hanno riportato valori di secrezione insulinica precoce normali o aumentati in entrambi i gruppi (21,22,31,32). Allo stesso modo, è stato riportato che la risposta insulinica tardiva, dopo 2 ore dal carico orale di glucosio, può essere aumentata (26) o ridotta (33) in soggetti con IGT rispetto a quelli con NGT.

Riguardo alla patogenesi del diabete, i risultati di questi studi trasversali devono essere interpretati con cautela, in quanto numerosi individui con IGT possono anche non sviluppare mai il diabete e le caratteristiche metaboliche di questi ultimi possono essere diverse da quelle di coloro che invece lo svilupperanno. Di recente, diversi studi prospettici, in cui gli individui venivano caratterizzati dal punto di vista metabolico in una singola occasione e quindi seguiti per diversi anni per valutare chi sviluppava il diabete, hanno contribuito ad identificare anomalie metaboliche che predispongono al diabete stesso. Questi studi hanno dimostrato che l'obesità (35-37,41-43,47) e l'insulino-resistenza (38-43) predicono lo sviluppo di diabete in molte popolazioni, mentre l'EGO basale non è risultato predittivo nell'unico studio in cui è stato misurato (30). Una ridotta risposta precoce di secrezione insulinica predice il diabete nella maggior parte (30,40-47) ma non in tutti gli studi (39,40). Nel loro insieme questi risultati indicano che difetti sia nell'azione che nella secrezione insulinica predispongono alcuni individui con NGT al diabete, ma forniscono poche informazioni circa il periodo di tempo con cui queste anomalie cambiano in funzione del peggioramento della tolleranza glucidica.

Per determinare la storia naturale della disfunzione secretoria dell'insulina e della resistenza all'insulina durante lo sviluppo del diabete, e per capire come questi fattori interagiscono con altri durante lo sviluppo della malattia, sono necessari studi longitudinali nei quali la secrezione insulinica e l'azione insulinica siano ripetutamente misurate nei soggetti man mano che questi passano dalla NGT all'IGR e infine al diabete tipo 2 (23,20,48,50). Tali studi sono fattibili solo in popolazioni con un'alta incidenza di diabete dove i soggetti possano essere seguiti strettamente nel corso di alcuni anni (38,40,51). Uno studio longitudinale negli Indiani Pima dell'Arizona, la popolazione con la più alta prevalenza documentata di diabete tipo 2 nel mondo (36), mostra chiaramente che gli individui che sviluppano il diabete dimostrano un progressivo peggioramento dell'azione insulinica e della secrezione insulinica e ciò contribuisce direttamente al peggioramento della tolleranza glucidica. Inoltre, tali risultati indicano che questi difetti progressivi si manifestano precocemente durante lo sviluppo del diabete, durante il passaggio da NGT a IGT, e peggiorano quando la tolleranza glucidica si deteriora ulteriormente verso il diabete. Un incremento dell'EGO è evidente solo durante la transizione da IGT a diabete, e perciò rappresenta un'anormalità relativamente tardiva. L'incapacità di compensare sia il difetto dell'azione insulinica, che il difetto della secrezione insulinica distingue gli individui che sviluppano il diabete da quelli che conservano una normale tolleranza glucidica. Tale informazione è critica nel definire l'adeguato fenotipo che deve essere utilizzato per la ricerca dei geni responsabili della suscettibilità al diabete tipo 2. Questi dati, però, possono essere fortemente influenzati dallo specifico gruppo etnico, rendendo assolutamente necessaria la definizione di un fenotipo autoctono. Dopo l'introduzione dell'IFG, alcuni gruppi di ricerca hanno riesaminato i loro archivi ed hanno riportato che anche la semplice IFG, cioè l'iperglicemia a digiuno con concomitante normale tolleranza glucidica, è una situazione ad elevato rischio di evolvere verso il diabete mellito tipo 2. Perciò, da un punto di vista epidemiologico,



l'IGR (IFG e/o IGT) è uno stadio intermedio tra la normale omeostasi glucidica ed il diabete tipo 2. Tali evidenze sottolineano che l'IGR è uno stato dinamico, relativamente instabile, un passaggio obbligato verso il diabete mellito tipo 2. Perciò, lo studio di questo gruppo ad elevato rischio si configura come un approccio molto promettente per definire le caratteristiche fenotipiche che predicono l'evoluzione verso il diabete tipo 2.

Inoltre, il fatto, che un'alta percentuale di individui con IGR evolva sia verso il diabete che verso la normale omeostasi glucidica fornisce una opportunità unica per confrontare individui che partendo dalla stessa classe di omeostasi glucidica si differenziano, presumibilmente, solo per quelle caratteristiche metaboliche strettamente correlate al diabete tipo 2.

Come stato pre-diabetico, l'IGR è possibile che condivida con il diabete tipo 2 il diritto di essere considerato una condizione complessa, se non proprio una malattia, poiché molti si opporrebbero a considerarla una autonoma condizione patologica. L'aggettivo complesso qui si riferisce ad un complicato intreccio di fattori ambientali ed alla suscettibilità genetica, di tipo non-monogenico non-Mendeliano. La scelta delle più moderne strategie per identificare i geni implicati in una malattia complessa richiederebbe una conoscenza a priori del modello di complessità genetica al quale il diabete tipo 2 assomiglia (52-56). La complessità genetica può essere dovuta ad una diversità allelica e/o non-allelica. Riguardo alla diversità allelica, due sono i modelli teoricamente possibili che possiamo prendere in considerazione. Secondo il modello di polimorfismo genico ristretto, un numero relativamente piccolo di alleli polimorfici comuni (frequenza  $>0.01$ ), originanti da un limitato numero di loci, è responsabile della predisposizione genetica al diabete, con una parte minore di predisposizione genetica dovuta ad altri loci (54,56).

Nel modello di "rischio multi-equivalente" un grande numero di alleli di rischio su loci diversi determina la suscettibilità alla malattia, con alcuni alleli ad effetto equivalente.

In tale modello la maggior parte degli alleli di rischio sono a bassa frequenza nella popolazione ( $<0.01$ ) (54-56).

La diversità non-allelica, ad esempio la presenza di numerosi geni di malattia, è già considerata nel modello di rischio multi-equivalente della diversità allelica, ma può contribuire alla complessità genetica anche in presenza di condizioni compatibili con il modello del polimorfismo ristretto di diversità allelica (54,56). Negli ultimi due anni, la lunga caccia ai geni del diabete tipo 2 ha portato ad alcuni risultati significativi in almeno due distinti gruppi etnici: i Messicani-Americani ed i Finlandesi (57,58). In entrambi i casi, i loci di malattia sono rappresentati da un singolo allele con alta prevalenza di popolazione (57,58). Questi risultati indicano, in modo chiaro, che il diabete tipo 2 dell'uomo potrebbe ben ricadere nel modello di polimorfismo ristretto. I modelli di animale transgenico del diabete tipo 2 ricadono nella classe delle malattie oligogeniche. Per quanto nessuno di questi modelli animali possa, secondo le attuali conoscenze, rappresentare una copia del genotipo del diabete tipo 2 dell'uomo, essi forniscono ulteriori elementi a favore dell'ipotesi che il diabete umano possa essere, analogamente, una condizione oligogenica.

Un ulteriore problema deriva dal considerare una malattia complessa quale il diabete, come il risultato dell'intersezione di alcuni fenotipi intermedi sfavorevoli, sotto un distinto controllo genetico (56,58). La lezione derivabile dall'epidemiologia e dalla fisiopatologia della storia naturale del diabete è che esistono almeno due di tali fenotipi fisiopatologici intermedi: la resistenza all'insulina e la ridotta secrezione insulinica. L'IGR può essere considerato come il fenotipo intermedio più vicino al diabete tipo 2 fin qui identificato per quanto ancora distinto dal diabete, come mostrato dal gran numero di individui IGR che recuperano e mantengono per tutta la vita, una normale omeostasi glucidica. Critica per l'identificazione di una buona strategia di ricerca genica è la valutazione della frequenza allelica della malattia e dell'alterazione fenotipica causata dall'allele di malattia (54,56,58). Quando si

consideri l'IGR ed il diabete tipo 2, l'alterazione dei fenotipi di secrezione insulinica e azione insulinica è relativamente piccola, anche qualora si volesse attribuire un allele per fenotipo. Come già riportato, i soli due geni sicuramente riconoscibili come diabetogeni nel diabete tipo 2 dell'uomo presentano un'alta frequenza (57,58).

Lo scenario emergente, quindi, è quello in cui il diabete tipo 2 può essere collocato nella classe delle malattie complesse con alleli di malattia a polimorfismo ristretto, oligogenico (59), ad alta frequenza capaci di causare modeste alterazioni fenotipiche. Per queste condizioni, l'idea emergente è che probandi sicuramente non correlati ai controlli siano non meno potenti in uno studio di linkage disequilibrium (LD), e molto più potenti in uno studio di associazione (56,58), rispetto a probandi "sib" con i controlli correlati (58,60). La recente identificazione dell'allele Pro12Ala del gene PPAR-gamma come allele diabetogeno è un notevole esempio di questa possibilità: uno studio LD basato su "sibpairs" avrebbe richiesto alcuni milioni di sibpairs affetti per mostrare un significativo legame, mentre lo studio di associazione potrebbe individuare tale "diabetogene" con circa 1000 individui (61).

Un ulteriore punto da esaminare è la possibile influenza confondente che una mescolanza genetica non apprezzata può esercitare sull'associazione tra un locus genico ed un fenotipo (62,63). E' noto che la mappa genetica italiana mostra una notevole somiglianza con le mappe etniche e linguistiche d'Italia nei secoli prima dell'Impero Romano (64). Perciò gli Italiani non possono essere considerati una popolazione omogenea dal punto di vista genetico. Questo è uno svantaggio nel caso di diversità non-allelica, a meno che il campione di popolazione studiato non appartenga ad un'area omogenea, come per esempio le aree geografiche che corrispondono all'antica Etruria o alla Magna Grecia. In questo caso un risultato positivo potrebbe rappresentare una falsa positività dovuta alla non riconosciuta stratificazione della sottostante popolazione tale da richiedere la replica del risultato in popolazioni geneticamente distinte. Di contro, un campione proveniente da

popolazioni geneticamente eterogenee ha il vantaggio di possedere un intrinseco controllo nei confronti di possibili risultati falsamente positivi, poiché ogni tendenza originante dalla sottostante stratificazione difficilmente sarebbe mantenuta nell'ambito di popolazioni geneticamente distinte.

Pertanto, evidenze epidemiologiche, fisiopatologiche e genetiche confluiscono tutte nell'indicare un fenotipo intermedio come ideale da investigare di per sé, e soprattutto per acquisire informazioni preziose sul diabete tipo 2. Le argomentazioni epidemiologiche e fisiopatologiche necessitano di uno studio longitudinale su un fenotipo intermedio da seguire, fino a quando non si manifesti il diabete tipo 2 così da poter identificare i predittori fenotipici migliori dello sviluppo della malattia. Considerazioni genetiche suggeriscono l'opportunità di uno studio di associazione con controlli non correlati come la strategia più potente per identificare i "diabetogeni" più significativi. La possibilità di ottenere risultati specifici va a favore di uno studio multicentrico in aree geneticamente distinte dell'Italia. Inoltre, l'Italia potrebbe rivelarsi una sede favorevole per uno studio di tale tipo data l'ampia rete di Centri Diabetologici altamente specializzati diffusi sul territorio nazionale. Infine, l'uso di metodi semplici, ma affidabili, per descrivere i meccanismi patogenetici, secrezione (65) e azione (66) dell'insulina, renderà il lavoro più semplice e più efficace.

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

1. Determinare, nella popolazione italiana, i meccanismi fisiopatologici responsabili dei disordini della regolazione del glucosio (IGR)
2. Identificare i markers biochimici della evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2
3. Identificare i markers fisiopatologici della evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2.
4. Identificare i markers genetici della evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2.
5. Determinare la prevalenza dei markers di autoimmunità  $\beta$ -cellulare e valutare la loro capacit  di predire l'evoluzione della IGR in diabete mellito di tipo 2.

### **3. TIPOLOGIA DEI SOGGETTI E NUMERO TOTALE PREVISTO**

#### **A. Studio Trasversale (screening dell'IGR):**

Saranno inclusi nello screening i soggetti che rispondono ai seguenti criteri di inclusione ed esclusione. La fase di screening durerà due anni. Lo scopo di questa fase è quello di reclutare 1000 soggetti con IGR per anno, per un totale di 2000 soggetti.

#### **Criteri di inclusione**

Entrambi i sessi, età fra 25 e 65 anni

Invio al Centro per, o prescrizione del Centro stesso di, esecuzione di carico orale di glucosio (75 g)

Consenso informato per partecipare allo studio

Etnia italiana

#### **Criteri di esclusione**

Glicemia a digiuno  $\geq 126$  mg/dl (7.0 mmol/L)

Gravidanza

Allattamento

BMI  $\geq 39$  kg/m<sup>2</sup>

Creatininemia > del limite superiore di normalità presso il laboratorio del Centro

ALT e/o AST  $\geq 2$  volte il limite superiore di normalità presso il laboratorio del Centro

Gravi affezioni cardiovascolari, neurologiche, ematologiche, endocrinologiche, gastrointestinali, nefrologiche o pneumologiche in atto o pregresse

Presenza di malattie autoimmuni o del connettivo

Trattamento in corso con antidiabetici, diuretici, diazossido, glucocorticoidi, contraccettivi orali, GH, catecolamine, somatostatina, ormoni tiroidei in dosi soppressive del TSH, aloperidolo, clorprotixene, litio, fenotiazine, antidepressivi triciclici, difenilidantoina, L-Dopa, indometacina, antineoplastici, isoniazide

Etilismo

Soggetti affetti da disturbi mentali, o prevedibilmente non idonei a comprendere e a rilasciare un valido consenso informato scritto all'esecuzione dello studio

Soggetti affetti da disturbi mentali, o prevedibilmente non idonei a comprendere ed eseguire gli adempimenti previsti dallo studio

Recenti malattie flogistiche e/o infiammatorie con o senza febbre

## **B. Studio Longitudinale**

### **Criteri di inclusione**

Partecipazione allo studio trasversale

Diagnosi di IGR

### **Criteri di esclusione**

Diagnosi di diabete

Normale omeostasi del glucosio

## **4. DISEGNO SPERIMENTALE**

### **A. Studio Trasversale**

I soggetti che potenzialmente soddisfano i criteri di inclusione/esclusione verranno sottoposti alle seguenti valutazioni in fase di screening:

- Compilazione di una scheda biografico-anamnestica standardizzata

- Esame obiettivo standardizzato

- ECG (registrato in data non anteriore a 3 mesi dalla visita)

- Prelievo ematico per il laboratorio locale per il dosaggio di: emocromo con formula e piastrine, glicemia, creatininemia, AST, ALT, HbA<sub>1c</sub>

A discrezione dell'investigatore, i soggetti che soddisfano i criteri di inclusione/esclusione sulla base della scheda biografico-anamnestica e dell'esame obiettivo potranno essere sottoposti nella stessa mattina anche alle valutazioni successive, qui di seguito elencate, salvo successiva esclusione imposta dagli esami ematochimici. Alternativamente, l'investigatore può decidere di sottoporre alle seguenti valutazioni, da effettuarsi in una successiva mattina, solo i soggetti che in base a tutte valutazioni della fase di screening (anamnesi, esame obiettivo e indici ematochimici) soddisfano i criteri di inclusione/esclusione.

Saranno effettuate le seguenti valutazioni:

- Prelievo basale per colesterolo totale, LDL e HDL, trigliceridi (da inviare al laboratorio centrale)

- Prelievo basale per autoanticorpi anti-GAD e anti-IA2 (da inviare al laboratorio centrale)



Campione di urine spot per il dosaggio del rapporto albumina/creatinina (da inviare al laboratorio centrale)

Prelievo del sangue intero per DNA e HbA<sub>1c</sub> (da inviare al laboratorio centrale)

Prelievo basale di plasma e siero per futuri dosaggi (da inviare al laboratorio centrale)

Esecuzione di OGTT standard (75 g di glucosio) con prelievi a -10', 0', 15', 30', 60', 90', 120' per glicemia (da inviare al laboratorio locale), C-peptide e insulina (da inviare al laboratorio centrale).

## **B. Studio Longitudinale**

Ai soggetti che in base alle valutazioni della fase di screening e dello studio trasversale soddisfano i criteri di inclusione/esclusione per lo studio longitudinale verranno fornite le seguenti indicazioni, di cui verrà informato il Medico Curante:

Prescrizione di dieta bilanciata pari al 90% della spesa energetica basale stimata con la formula di Benedict

Prescrizione di almeno due sedute alla settimana della durata di 30' ciascuna di esercizio fisico aerobio, commisurato alle caratteristiche del paziente (~60% della VO<sub>2</sub>max predetta in rapporto all'età e al sesso ed espressa in MET; 1 MET = 3.5 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>) (67).

## **Controlli predisposti**

Al 2°, 4° e 6° anno di follow-up, i soggetti saranno richiamati dal Centro e sottoposti alle seguenti valutazioni:

Compilazione di una scheda biografico-anamnestica standardizzata per il follow-up

Esame obiettivo standardizzato

ECG (registrato in data non anteriore a 3 mesi dalla visita)

Prelievo ematico per il laboratorio locale per il dosaggio di: emocromo con formula e piastrine, glicemia, creatinemia, AST, ALT, HbA<sub>1c</sub>

Prelievo basale per colesterolo totale, LDL ed HDL, trigliceridi (da inviare al laboratorio centrale)

Prelievo basale per autoanticorpi anti-GAD e anti-IA2 (da inviare al laboratorio centrale)

Compioni di urine spot per il dosaggio del rapporto albumina/creatinina (da inviare al laboratorio centrale)

Prelievo sangue intero per DNA e HbA<sub>1c</sub> (da inviare al laboratorio centrale)

Prelievo basale di plasma e siero per futuri dosaggi (da inviare al laboratorio centrale)

Esecuzione di OGTT standard (75 g di glucosio) con prelievi a -10', 0', 15', 30', 60', 90', 120' per glicemia (da inviare al laboratorio locale), C-peptide ed insulina (da inviare al laboratorio centrale)

### **Controlli intermedi**

Al 1°, 3° e 5° anno di follow-up, i soggetti saranno richiamati dal centro e sottoposti alle seguenti valutazioni:

Aggiornamento della scheda clinica individuale

Prelievo a digiuno per glicemia ed emoglobina glicata A<sub>1c</sub> (da inviare al laboratorio locale)

## **5. PROCEDURE DELLO STUDIO**

### **A. Studio Trasversale**

Visita 1 (tempo 0)

Per ogni soggetto che abbia fornito il proprio consenso informato scritto a partecipare allo studio si eseguiranno:

Compilazione di una scheda biografico-anamnestica standardizzata

Esame obiettivo standardizzato

Misurazione della pressione arteriosa (PA) e della frequenza cardiaca (FC) con soggetto seduto da almeno 5 minuti, sfigmomanometro a mercurio, tre misurazioni della PA e della FC, eseguite dallo stesso esaminatore a distanza di ~2 min, approssimando i valori di pressione ai 2 mm Hg)

ECG (registrato in data non anteriore a 3 mesi dalla visita)

Prelievo ematico per il laboratorio locale per il dosaggio di: emocromo con formula e piastrine, glicemia, creatinemia, AST, ALT, HbA<sub>1c</sub>

Solo per i soggetti che soddisfano i criteri di inclusione/esclusione rilevabili con esame obiettivo e scheda biografico-anamnestica:

Campione di urine spot per il dosaggio del rapporto albumina/creatinina

Soggetto disteso su lettino o in una cosiddetta "cardiac chair"

Inserimento di un ago a farfalla o di un'agocannula in una vena dell'avambraccio, da lasciare in situ per tutta la durata del test e da cui operare i prelievi

Periodo di 10' di riassetamento

Prelievo basale per DNA, colesterolo Totale, LDL e HDL, trigliceridi, autoanticorpi anti-GAD e anti-IA2, e per futuri dosaggi

Esecuzione di OGTT standard (75 g di glucosio) con prelievi a -10', 0', 15', 30', 60', 90', 120' per glicemia (da inviare al laboratorio locale), C-peptide, insulina (da inviare al laboratorio centrale)

Visita 1b (a distanza di 1-3 settimane dalla visita 1, solo nel caso la seconda parte della visita 1 non sia stata eseguita)

I soggetti che soddisfano i criteri di inclusione/esclusione dello Studio Trasversale, e che non hanno effettuato la seconda parte di valutazioni della visita 1, verranno sottoposti alle seguenti valutazioni

Soggetto a digiuno dalla sera precedente

Campione di urine spot per il dosaggio del rapporto albumina/creatinina

Soggetto disteso su lettino o in una cosiddetta "cardiac chair"

Inserimento di un ago a farfalla o di un'agocannula in una vena dell'avambraccio, da lasciare in situ per tutta la durata del test e da cui operare i prelievi

Periodo di 10' di riassetamento

Prelievo basale per DNA, Colesterolo totale, LDL e HDL, trigliceridi, autoanticorpi anti-GAD e anti-IA2, e per futuri dosaggi

Esecuzione di OGTT standard (75 g di glucosio) con prelievi a -10', 0', 15', 30', 60', 90', 120' per glicemia (da inviare al laboratorio locale), C-peptide ed insulina (da inviare al laboratorio centrale).

## **B. Studio Longitudinale**

Ai soggetti che soddisfano i criteri di inclusione/esclusione dello Studio Longitudinale verranno date le seguenti indicazioni, di cui verrà informato il Medico Curante:

Prescrizione di dieta bilanciata pari al 90% della spesa energetica basale stimata con la formula di Benedict

Prescrizione di almeno due sedute alla settimana della durata di almeno 30' ciascuna di esercizio fisico aerobio, commisurato alle caratteristiche del paziente (~60% della VO<sub>2</sub>max predetta in rapporto all'età e al sesso ed espressa in MET;

1 MET = 3.5 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>) (67)

## **Visita 2 (2 anni dopo Visita 1)**

Soggetto a digiuno dalla sera precedente

Compilazione di scheda anamnestica standardizzata

Esame obiettivo standardizzato

Misurazione della PA e della frequenza cardiaca (soggetto seduto da almeno 5 minuti, sfigmomanometro a mercurio, tre misurazioni della PA e della FC, eseguite dallo stesso esaminatore a distanza di ~2 min, approssimando i valori di pressione ai 2 mm Hg)

ECG (registrato in data non anteriore a 3 mesi dalla visita)

Campione di urine spot per il dosaggio del rapporto albumina/creatinina

Soggetto disteso su lettino o in una cosiddetta "cardiac chair"

Inserimento di un ago a farfalla o di un agocannula in una vena dell'avambraccio, da lasciare in situ per tutta la durata del test e da cui operare i prelievi

Periodo di 10' di riassetamento

Prelievo ematico per il laboratorio locale per: emocromo con formula e piastrine, creatininemia, AST, ALT, ALP, HbA<sub>1c</sub>

Prelievo basale per Colesterolo totale, LDL e HDL, trigliceridi, autoanticorpi anti-GAD e anti-IA2, e per futuri dosaggi

Esecuzione di OGTT standard (75 g di glucosio) con prelievi a -10', 0', 15', 30', 60', 90', 120' per glicemia (da inviare al laboratorio locale), C-peptide ed insulina (da inviare al laboratorio centrale).

**Visita 3 (4 anni dopo visita 1)**

Identica a Visita 2

**Visita 4 (6 anni dopo visita 1)**

Identica a Visita 2

Se nell'intervallo fra le visite o nell'occasione di una visita programmata venisse posta la diagnosi di diabete, il follow-up verrà interrotto per permettere al paziente di essere sottoposto alla terapia più appropriata. All'interruzione, si eseguirà una valutazione finale secondo lo schema di Visita 2.

## **6. EVENTI DA SEGNALARE**

Si considerano eventi da segnalare e annotare in scheda biografico anamnestica con la data:

la progressione allo stato di diabete

l'interruzione prematura dello studio (motivazione)

qualsiasi evento patologico rilevante, con particolare attenzione agli eventi cardiovascolari (ictus, angina, infarto del miocardio, interventi di rivascolarizzazione, ecc.)

decesso, includendone accurata descrizione delle cause

## **7. INTERRUZIONI PREMATURE**

I soggetti arruolati possono interrompere lo studio in qualsiasi momento per decisione propria o dello sperimentatore. Le ragioni della sospensione devono essere correttamente riportate nella scheda biografico-anamnestica del soggetto.



## **8. STATISTICA**

### **Dimensione del campione**

Sulla base di calcoli di simulazione, è possibile stimare che circa il 40% dei soggetti partecipanti allo studio trasversale verranno diagnosticati come IGR e saranno arruolabili nello studio longitudinale. Del campione incluso nello studio longitudinale, il 20-25% potrebbe progredire a diabete nei 6 anni del follow-up, circa il 30% potrebbe ritornare a normale omeostasi del glucosio, mentre i rimanenti rimarrebbero nella classe di IGR. Con una partecipazione di 5000 soggetti nello studio trasversale, vi saranno 2000 soggetti eleggibili per lo studio longitudinale, di cui 400-500 progredirebbero a diabete nell'arco dei 6 anni del follow-up, circa 600 ritornerebbero a normale omeostasi del glucosio e circa 900-1000 rimarrebbero stabili nella classe IGR. Questi eventi individuerebbero 3 gruppi distinti: i 'progredienti' (a diabete tipo 2), i 'non progredienti' e i 'regredienti' (a normale omeostasi del glucosio).

### **Analisi Statistica**

Nello Studio Trasversale, l'elevata numerosità attesa nei due gruppi (IGR e normale omeostasi del glucosio) garantirà una grande potenza statistica per il confronto delle variabili continue. Il calcolo della potenza statistica per la rilevazione delle influenze di vari alleli polimorfici sulle variabili fenotipiche è pressoché impossibile a priori. Tuttavia, per alleli con elevata frequenza e con influenza media sul trait fenotipico di grado non particolarmente modesto (ad es. Pro12Ala del gene PPAR-gamma e Gly972Ser del gene dell'IRS-1) la potenza statistica è adeguata per essere quantomeno in grado di confermare dati precedentemente riportati in letteratura.

Nello Studio Longitudinale, le numerosità attese in 'progredienti', 'non progredienti' e 'regredienti' sono tali da poter garantire l'identificazione di differenze anche piccole nei parametri a distribuzione continua misurati nello stato basale. Inoltre, queste numerosità dovrebbero essere sufficienti per l'identificazione di marker genetici di progressione (o regressione) ad alta frequenza e con influenza di grado medio sul fenotipo. Poiché i dati attuali fanno ritenere che il diabete di tipo 2 sia una malattia poli/oligogenica a polimorfismo ristretto, questo studio ha una potenza statistica adeguata.

## **9. ASPETTI ETICI**

### **Consenso informato**

Lo studio dovrà essere interamente condotto in accordo alla Dichiarazione di Helsinki (revisione di Honk-Kong 1989). Oltre a ricevere dal medico del Centro esaurienti spiegazioni sugli scopi, metodi, benefici e potenziali rischi dello studio, il soggetto deve inoltre essere informato sul proprio diritto sia a rifiutare la partecipazione, sia a ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento. Il consenso informato deve essere sempre documentato dalla firma, datata, del soggetto sull'apposito "Modulo di Consenso Informato".

### **Confidenzialità dei dati**

Gli sperimentatori si impegnano con i soggetti partecipanti allo studio a mantenere confidenziali tutte le informazioni che verranno raccolte. A tale scopo tutti i dati saranno conservati in file informatici protetti, non accessibili a chi non sia a conoscenza dei codici di accesso. A ciascun soggetto sarà assegnato un codice alfa-numerico, con il quale saranno identificati i campioni, le schede e tutte le informazioni che verranno centralizzate. Solo nel Centro di origine esisterà la chiave di conversione dal codice alfa-numerico all'identità del soggetto, e sarà conservata in sede separata e ad accesso rigidamente limitato rispetto ai dati, ai file e a tutta la corrispondenza relativa allo studio.

### **Comitato Etico**

Lo studio in oggetto dovrà essere sottoposto alla valutazione e all'approvazione del Comitato Etico locale, se esiste, o di un Comitato Etico indicato dall'Azienda

Ospedaliera, o dall'Azienda Sanitaria Locale, o dalla Università, o dall'Azienda in genere cui appartiene il Centro.

## **10. EMENDAMENTI AL PROTOCOLLO**

La sperimentazione dovrà essere condotta secondo le linee guida definite dal presente protocollo di studio: ogni emendamento dovrà essere approvato sia dallo "Steering Committee" dello Studio Genfiev sia dal Comitato Etico. Durante lo svolgimento dello studio, non saranno permesse procedure o misure aggiuntive o diverse da quelle indicate nel protocollo di studio, a meno che tali misure siano prese per la salvaguardia o la sicurezza del soggetto.

## **11. FINANZIAMENTO DELLO STUDIO**

Lo studio è finanziato dalla Fondazione Ricerca della Società Italiana di Diabetologia (Fo.Ri.SID). Tutte le spese relative alla gestione, esecuzione degli esami ed analisi dei dati sono coperte da questo finanziamento.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P: The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 14 (Suppl. 5):S7–S85, 1997.
- 2) Zimmet P, Lefebvre P: The global NIDDM epidemic: treating the disease and ignoring the symptom. *Diabetologia* 39 : 1247–1248, 1996.
- 3) Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183–1197, 1997.
- 4) WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications :Report of a WHO Consultation. Part I: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. World Health Organization, Geneva, 1999.
- 5) Harris MI, Eastman RC, Cowie CC, Flegal KM, Eberhardt MS: Comparison of diabetes diagnostic categories in the U.S. population according to 1997 American Diabetes Association and 1980–1985 World Health Organization diagnostic criteria. *Diabetes Care* 20:1859–1862, 1997.
- 6) De Vegt F, Dekker JM, Stehouwer CDA, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ: The 1997 American Diabetes Association criteria versus the 1985 World Health Organization criteria for the diagnosis of abnormal glucose tolerance. *Diabetes Care* 21:1686–1690, 1998.
- 7) Shaw JE, Zimmet PZ, de Courten M, Dowse GK, Gareeboo H, Hemraj F et al. IFG or IGT: what best predicts future diabetes? A view of the new ADA recommendations. *Diabetes Care* 22: 399-402, 1999.
- 8) Larsson H, Berglund G, Lindgärde F, Ahrén B. Comparison of ADA and WHO criteria for diagnosis of diabetes and glucose intolerance. *Diabetologia* 1998; 41: 1124–1125.
- 9) Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H. Coronary heart disease risk and impaired glucose tolerance: the Whitehall Study. *Lancet* 1980; i: 1373–76.
- 10) Alberti KGMM. The clinical implications of Impaired Glucose Tolerance. *Diabet Med* 1996; 13: 927–37.
- 11) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595–607.
- 12) National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 28:1039–1057.
- 13) World Health Organization. 1985. Diabetes mellitus: report of a WHO study group. World Health Organization Technical Report Series, Volume 17. 45 pp.
- 14) American Diabetes Association. 1998. Report of an expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 21(Suppl. 1):S5–S19.
- 15) Reaven, G.M. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37:1595–1607.
- 16) DeFronzo, R.A. 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews*. 5:177–269.
- 17) DeFronzo, R.A., Bonadonna, R.C., and Ferrannini, E. 1992. The pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 15:318–368.
- 18) Groop, L.C., Widen, E., and Ferrannini, E. 1993. Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: errors of metabolism or of methods? *Diabetologia*. 36:1326–1331.
- 19) Taylor, S.I., Accili, D., and Imai, Y. 1994. Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes*. 43:735–740.
- 20) Ferrannini, E. 1998. Insulin resistance vs. insulin deficiency in non-insulin- dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr. Rev.* 19:477–490.

- 21) Reaven, G.M., and Olefsky, J.M. 1977. Relationship between heterogeneity of insulin responses and insulin resistance in normal subjects and patients with chemical diabetes. *Diabetologia*. 13:201–206.
- 22) Reaven, G.M., Hollenbeck, C.B., and Chen, Y.D.I. 1989. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia*. 32:52–55.
- 23) Bogardus, C., Lillioja, S., Howard, B.V., Reaven, G., and Mott, D.M. 1984. Relationships between insulin secretion, insulin action and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 74:1238–1246.
- 24) Cerasi, E., Luft, R., and Efendic, S. 1972. Decreased sensitivity of the pancreatic beta cells to glucose in prediabetic and diabetic subjects. A glucose dose-response study. *Diabetes*. 21:224–234.
- 25) Eriksson, J., et al. 1989. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 321:337–343.
- 26) Pimenta, W., et al. 1996. Insulin secretion and insulin deficiency in people with impaired glucose tolerance. *Diabet. Med.* 13:S33–S36.
- 27) Yoneda, H., et al. 1992. Analysis of early-phase insulin responses in non-obese subjects with mild glucose intolerance. *Diabetes Care*. 15:1517–1521.
- 28) O’Rahilly, S.P., et al. 1986. Beta-cell dysfunction, rather than insulin insensitivity, is the primary defect in familial type 2 diabetes. *Lancet*. 2:360–364.
- 29) Kosaka, K., Kuzuya, T., Hagura, R., and Yoshinaga, H. 1996. Insulin response to oral glucose load is consistently decreased in established non-insulin dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 13:S109–S119.
- 30) Pimenta, W., et al. 1995. Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. *JAMA*. 273:1855–1861.
- 31) Perseghin, G., Ghosh, S., Gerow, K., and Shulman, G.I. 1997. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents. A cross-sectional study. *Diabetes*. 46:1001–1009.
- 32) Gulli, G., Ferrannini, E., Stern, M., Haffner, S., and DeFronzo, R.A. 1992. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican American NIDDM parents. *Diabetes*. 41:1575–1586.
- 33) Zimmet, P., Whitehouse, S., Alford, F., and Chisholm, D. 1978. The relationship of insulin response to a glucose stimulus over a wide range of glucose tolerance. *Diabetologia*. 15:23–27.
- 34) Haffner, S.M., Miettinen, H., Gaskill, S.P., and Stern, M.P. 1996. Decreased insulin action and insulin secretion predict the development of impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 39:1201–1207.
- 35) Wilson, P.W., McGee, D.L., and Kannel, W.B. 1981. Obesity, very low density lipoproteins, and glucose intolerance over 14 years. The Framingham study. *Am. J. Epidemiol.* 114:697–704.
- 36) Knowler, W.C., Pettitt, D.J., Saad, M.F., and Bennett, P.H. 1990. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab. Rev.* 6:1–27.
- 37) Ohlson, L.D., et al. 1985. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 34:1055–1058.
- 38) Lillioja, S., et al. 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329:1988–1992.

- 39) Martin, B.C., et al. 1992. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes. Results of a 25-year follow-up study. *Lancet*. 340:925–929.
- 40) Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., and Kahn, C.R. 1990. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type 2 diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* 113:909–915.
- 41) Saad, M.F., et al. 1991. A two-step model for development of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 90:229–235.
- 42) Charles, M.A., et al. 1991. Risk factors for NIDDM in white population: Paris prospective study. *Diabetes*. 40:796–799.
- 43) Chen, K.W., et al. 1995. Earlier appearance of impaired insulin secretion than of visceral adiposity in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care*. 18:747–753.
- 44) Nagi, D.K., et al. 1995. Early and late insulin response as predictors of NIDDM in Pima Indians with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 38:187–192.
- 45) Warram, J.H., Sigal, R.J., Martin, B.C., Krolewski, A.S., and Soeldner, J.S. 1996. Natural history of impaired glucose tolerance: follow-up at Joslin Clinic. *Diabet. Med.* 13:S40–S45.
- 46) Efendic, S., Luft, R., and Wajngot, A. 1984. Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 5:395–410.
- 47) Lundgren, H., Bengtsson, C., Blohme, G., Lapidus, L., and Waldenstroem J. 1990. Fasting serum insulin concentration and early insulin response as risk determinants for developing diabetes. *Diabet. Med.* 7:407–413.
- 48) Kadowaki, T., et al. 1984. Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 26:44–49.
- 49) DeFronzo, R.A. 1988. Lilly Lecture 1987. The triumvirate: B-cell, muscle, liver. A collision responsible for NIDDM. *Diabetes*. 37:667–687.
- 50) Leahy, J.L. 1990. Natural history of b-cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care*. 13:992–1010.
- 51) Lillioja, S., and Bogardus, C. 1988. Obesity and insulin resistance: lessons learned from the Pima Indians. *Diabetes Metab. Rev.* 4:517–540.
- 52) Lander, ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2047, 1994.
- 53) Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517, 1996.
- 54) Wright, AF, Carothers AD, Pirastu M. Population choices in mapping genes for complex diseases. *Nature Genetics* 23: 397-404, 1999.
- 55) Kruglyak L. Prospects for whole genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics* 22: 139-144, 1999.
- 56) Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405: 847-856, 2000.
- 57) Mashima H, Schwarz PEH, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 26: 163-175, 2000.
- 58) Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl M-C, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPAR $\gamma$  Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 26: 76-80, 2000.
- 59) Cox NJ, et al. Loci on chromosome 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nature Genetics* 21: 213-215, 1999.
- 60) Altshuler D, Daly M, Kruglyak L. Guilt by association. *Nature Genetics* 26: 135-137, 2000.

- 61) Thompson EA, Neel JV. Allelic disequilibrium and allele frequency distribution as a function of social and demographic history. *Am J Hum Genet* 60: 197-204, 1997.
- 62) Harpending HC et al. Genetic traces of ancient demography. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1961-1967, 1998.
- 63) Menozzi P, Piazza A. The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton, 1994.
- 64) Piazza A, Cappello N, Olivetti E, Rendine S. A genetic history of Italy. *Ann Hum Genet* 52: 203-213, 1988.
- 65) Cretti, A., Lehtovirta, M., Bonora, E., Brunato, B., Zenti M.G, Tosi F., Caputo M., Caruso B., Groop L.C., Muggeo M., Bonadonna RC Assessment of  $\beta$ -cell function during the oral glucose tolerance test by a minimal model of insulin secretion *Eur J Clin Invest* 31: 405-416, 2001.
- 66) Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23: 57-63, 2000.
- 67) Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 32 (9 Suppl): S498-S504, 2000.



**ALLEGATI**

Allegato A.	Consenso informato
Allegato B.	Scheda di raccolta dati