

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN

“GENETICA E MEDICINA MOLECOLARE”



TESI DI DOTTORATO

CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICO-GENETICA DI SOGGETTI
SEVERAMENTE OBESI DELL'AREA CAMPANA

Candidata:
Nardelli Carmela

Relatore:
Prof. Lucia Sacchetti

Coordinatore:
Prof. Carmelo Bruno Bruni

Indice

Cap. 1 - Introduzione	pag. 3
1.1 - Definizione ed epidemiologia dell'obesità	pag. 3
1.1.1 - Eziopatogenesi dell'obesità	pag. 5
1.1.2 - Circuito della melanocortina	pag. 8
1.2 - La sindrome metabolica	pag. 17
1.2.1 - La definizione secondo la WHO	pag. 18
1.2.2 - La definizione secondo la NCEP	pag. 20
1.3 - Patologie legate alla sindrome metabolica	pag. 21
1.3.1 - Sindrome plurimetabolica e aterosclerosi	pag. 22
1.3.2 - Sindrome plurimetabolica e diabete mellito di tipo 2	pag. 23
1.4 - La patogenesi molecolare	pag. 26
1.4.1 - Fattori genetici e fattori ambientali	pag. 27
1.4.2 - Interazione genotipo-ambiente nello sviluppo della sindrome metabolica	pag. 29
1.5 - Le adipocitochine	pag. 32
Cap. 2 – Scopo	pag. 50
Cap. 3 - Materiali e metodi	pag. 52
3.1 - Soggetti	pag. 52
3.1.1 - Amplificazione del DNA genomico e sequenziamento	pag. 54
3.1.2 - Analisi mediante HPLC	pag. 56
3.1.3 - Protein Truncation Test	pag. 57
3.1.4 - Analisi biochimiche	pag. 58
3.1.5 - Analisi statistica	pag. 59
3.1.6 - Studio di predizione della struttura proteica	pag. 60

3.1.7 - Presenza della sindrome metabolica	pag. 60
3.1.8 - Calcolo del rischio Framingham	pag. 62
Cap. 4 – Risultati	pag. 63
Cap. 5 – Discussione	pag. 76
Cap. 6 - Bibliografia	pag. 86

Cap. 1 – Introduzione

1.1 - Definizione ed epidemiologia dell'obesità

L'obesità è una malattia cronica ad eziologia multifattoriale caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo. Recentemente l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha fissato i nuovi criteri che permettono di classificare l'obesità in base al BMI (Body Mass Index o Indice di Massa Corporea, ottenibile dal rapporto peso/altezza al quadrato – kg/m al quadrato): come limite superiore di normalità è stato fissato un valore di BMI di 24.9, mentre sono state definite Obesità di I, II e III grado quei valori di BMI compresi rispettivamente tra 25 e 29.9, fra 30 e 39.9 e maggiori di 40.

Essere sovrappeso od obeso aumenta il rischio di morbilità e mortalità causata dall'insorgenza di altre patologie quali diabete mellito di tipo 2, ipertensione, cardiopatie e alcune forme neoplastiche (1).

L'obesità rappresenta il più comune disordine nutrizionale nel mondo occidentale e la sua prevalenza è in progressivo aumento anche nei paesi in via di sviluppo (2).

Oggi esiste molta preoccupazione riguardo al proprio peso corporeo; infatti recenti stime indicano una prevalenza di obesità nel 15% della popolazione adulta europea, e in molte regioni sta aumentando. Indubbiamente l'incremento è legato al benessere e alla disponibilità di cibo nel mondo occidentale e a fattori socioculturali, a falsi e pericolosi modelli pubblicitari caratteristici della nostra epoca. I dati più preoccupanti giungono dagli Stati Uniti dove circa la metà della popolazione è in netto sovrappeso e circa un quarto è obesa. Più precisamente dati recenti indicano che il 22.5% della popolazione è obeso contro il 14.5% nel 1980 (3): gli esperti hanno definito tale esplosione una vera e propria epidemia di obesità che ha toccato tutti i gruppi demografici anche i bambini.

In Italia, le stime derivanti dai primi due trimestri dell'indagine ISTAT (1999/2000), considerando la classificazione dell'OMS (4) nelle quattro classi: sottopeso (BMI < 18,5), normopeso (BMI compreso tra 18,5-24,99), sovrappeso (BMI da 25 a 29,99) ed

obesità (BMI ≥ 30) (4), evidenziano che la maggioranza degli adulti, pari al 53,8% è in una condizione di normopeso, ben un adulto su tre risulta essere in sovrappeso (33,4%), il 9,1% è obeso ed il restante 3,6% è in condizione di sottopeso.

1.1.1 - Eziopatogenesi dell'obesità

La comprensione delle cause e delle modalità, attraverso cui l'obesità si sta diffondendo così rapidamente, costituisce l'oggetto di una sempre maggiore attenzione da parte di studiosi ed esperti, i quali concordano nel sottolineare l'esistenza di una forte interrelazione fra fattori genetici, fisiologici, metabolici, comportamentali e psicosociali.

L'obesità è quindi la risultante della combinazione variabile di due elementi: la suscettibilità genetica, cioè di una predisposizione genetica dell'individuo a diventare obeso, e la presenza di fattori ambientali (es.: facile accesso ad alimenti altamente energetici, sedentarietà). Si ritiene che la componente genetica incida per il 30-40% e quella ambientale/comportamentale per il rimanente 60-70% (5).

Lo stile di vita più diffuso infatti promuove un'assunzione di cibo eccessiva e scoraggia l'attività fisica. Sebbene l'organismo umano abbia evoluto eccellenti meccanismi fisiologici per difendersi dalla perdita di peso corporeo, esso ha invece scarse difese contro l'aumento di peso quando il cibo è abbondante. Il controllo delle dimensioni delle porzioni, il consumo di una dieta povera in grassi e una regolare attività fisica sono comportamenti che prevengono l'obesità, ma è sempre più difficile oggi mantenere un simile stile di vita. Inoltre si è più volte sottolineata la rilevanza assunta dagli aspetti psico-sociali in relazione all'insorgenza e alla diffusione della patologia. Da questo punto di vista, l'aumento dell'Obesità viene collegato a fattori molteplici: la relativa abbondanza di cibo, lo stile di vita sempre più sedentario, i ritmi frenetici che inducono a comportamenti affrettati anche in relazione all'assunzione dei pasti. Spesso si fa riferimento anche al bisogno relazionale dell'individuo che, se insoddisfatto, viene colmato con un consumo alimentare patologico: il cibo come compagno di vita!

Nel corso degli ultimi anni le ricerche svolte per migliorare la comprensione dello sviluppo dell'obesità hanno portato sempre più

a considerare anche i fattori genetici come pedine fondamentali nell'insorgenza dell'Obesità umana stimolando numerosi studi atti a valutare il ruolo dei fattori familiari.

Esistono numerosi lavori che insistono sull'elevata incidenza dell'Obesità nei figli di genitori obesi: le cifre variano da un'incidenza intorno al 40% se un solo genitore è obeso, a oltre il 70% se lo sono entrambi. Tuttavia, sarebbe del tutto errato parlare dell'Obesità senza tenere conto dei fattori ambientali, dal momento che alcuni genotipi prosperano in un determinato ambiente e meno in un altro e, viceversa, un certo ambiente esalterà alcune manifestazioni e ne inibirà altre (6). L'Obesità è ampiamente riconosciuta come una malattia ad andamento cronico, che può avere un notevole impatto sulla salute collettiva. Non solo è uno dei maggiori fattori determinanti in molte malattie non trasmissibili come il diabete mellito non insulino-dipendente e malattie coronariche, ma incrementa anche il rischio di disturbi biliari e di alcuni tipi di cancro, oltre a svolgere un ruolo nei disordini muscoloscheletrici e nei problemi respiratori. Malgrado tali evidenze, e senza prestare attenzione alla pressione sociale che

impone di essere magri, la prevalenza degli obesi sta crescendo, tanto da indurre gli esperti a credere che l'Obesità debba essere ritenuta uno dei maggiori e più trascurati problemi di salute pubblica del nostro tempo (7).

1.1.2 - Circuito della melanocortina

L'obesità può essere causata da un aumento dell'introito calorico, da una riduzione della spesa energetica o dalla combinazione di entrambi. La regolazione del peso corporeo è un meccanismo finemente regolato, in modo integrato, da numerose vie nervose, ormonali e metaboliche (8). Quando l'introito calorico supera la spesa energetica, l'eccesso di energia viene immagazzinato sotto forma di grasso. L'idea che esista un "set point" del peso corporeo, in ciascun individuo, è suggerita da meccanismi fisiologici che hanno dimostrato come nel tessuto adiposo esistano dei "sensori" in grado di indicare l'entità dei depositi di grasso e trasmettere poi questa informazione a recettori, o "adipostato", presenti a livello ipotalamico (8).

Se i depositi di grasso sono ridotti, il segnale che arriva all'adipostato è basso, e l'ipotalamo risponde stimolando la fame e riducendo la spesa energetica per conservare l'energia. Al contrario, quando i depositi di grasso sono abbondanti, avviene l'inverso.

Diversi neurotrasmettitori e neuropeptidi, secreti da una molteplicità di neuroni che interagiscono tra loro con effetti inibitori e stimolatori, creano una rete complessa di segnali idonei a regolare l'equilibrio energetico.

Principali elementi di questo sistema di controllo sono i neuroni peptidergici dell'ipotalamo. Nell'ipotalamo è localizzato il circuito della Melanocortina regolato dalla leptina, prodotta dal tessuto adiposo e che regola il senso di sazietà. La leptina (il cui nome deriva dal greco *leptos* che vuol dire magro) è un ormone prodotto dalle cellule adipose e la cui concentrazione in circolo è proporzionale al contenuto di grasso corporeo. La leptina oltrepassa la barriera emato-encefalica legandosi al suo recettore ipotalamico (ObRb), situato in due differenti sottopopolazioni di neuroni del nucleo arcuato, attivando così dei segnali che inibiscono l'introduzione di cibo ed aumentano il dispendio energetico. Una

popolazione di neuroni esprime entrambi i neuropeptidi oressizzanti (che stimolano l'appetito): Neuropeptide Y (NPY) ed Agouti Related Protein (AgRP), la cui espressione è ridotta dalla leptina (9); l'altra popolazione esprime entrambi i neuropeptidi anoressizzanti (che sopprimono l'appetito): Cocaine and Amphetamine Related Transcript (CART) ed il peptide α -MSH, derivato dal processo proteolitico, operato dagli enzimi proconvertasi (PC1 e PC2), del gene POMC (proopiomelanocortina). L'espressione di POMC è indotta dalla leptina (9).

Il Neuropeptide Y (NPY) è un peptide oressizzante prodotto nel nucleo arcuato che aumenta l'assunzione di cibo e riduce il consumo energetico. L'espressione dell'mRNA per l'NPY è inibito dalla leptina. L'AGRP è un peptide ipotalamico che stimola l'assunzione di cibo nel topo, interferendo con il legame tra α -MSH e MC4R. L'espressione del gene AGRP viene inibito dalla leptina. A livello dell'ipotalamo laterale, la concentrazione di ormone concentrante la melanina (MCH), un peptide oressizzante, viene aumentata dal digiuno e dalla carenza di leptina. Modificazioni del

gene per l'MCH o la somministrazione di un antagonista del recettore MCH1, determina ipofagia e perdita di peso nei roditori. Il glucagone-like peptide-1 (GLP-1) e la neurotensina sono peptidi che inibiscono la capacità del MCH di indurre il senso della fame. La leptina induce una ridotta espressione genica degli endocannabinoidi che agiscono come recettori per i cannabinoidi ed aumentano il senso di fame. Inoltre, la leptina stimola l'espressione di geni che codificano peptidi anoressizzanti. L' α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), un peptide derivato dalla proopiomelanocortina (POMC), ed il transcript cocaina- ed anfetaminaregolato, sono peptidi ipotalamici espressi dalla stessa famiglia di neuroni nel nucleo arcuato dell'ipotalamo. Questi peptidi vengono sintetizzati sotto lo stimolo della leptina e inducono anoressia.

AgRP e α -MSH competono, a livello ipotalamico, per il legame ai recettori della Melanocortina (MC-Rs), in particolare per il sottotipo 4 (MC4R).

È attualmente accreditato il fatto che l'interazione tra AgRP e α -MSH a livello dei recettori MC4R sia critica per il mantenimento

dell'omeostasi energetica (10). L'attivazione di MC4R da parte di α -MSH riduce la quantità di cibo assunta, mentre l'inibizione dello stesso da parte di AgRP aumenta il food-intake. Nell'uomo un'obesità severa è correlata con mutazioni nei geni POMC, PC1, PC2 e MC4R (10, 11, 12). Queste osservazioni suggeriscono che questo pathway è importante per l'omeostasi energetica sia nei roditori che nell'uomo e perciò costituisce oggetto di intensi studi.

Anche i tessuti gastrointestinali convogliano informazioni riguardanti il bilancio energetico verso il cervello, attraverso vie neurali ed endocrine. L'insulina ed il suo recettore sono stati studiati tradizionalmente per il loro ruolo nella omeostasi del glucosio. Ci sono ora prove crescenti che gli effetti a livello centrale dell'insulina sono paralleli a quelli della leptina; la somministrazione a livello centrale dell'insulina o di insulino-mimetici, riduce l'assunzione di cibo e la massa corporea, mentre una disfunzione dei recettori insulinici ipotalamici causa iperfagia ed insulino-resistenza.

Un altro peptide, la grelina, prodotto dallo stomaco, l'intestino, l'ipofisi e forse l'ipotalamo, è stato originariamente descritto come

un induttore del rilascio di GH, ma più recentemente sono state dimostrate le sue funzioni come peptide oressizzante. L'iniezione intracerebroventricolare di grelina stimola il metabolismo nel ratto, incrementando il peso corporeo attraverso la stimolazione dei neuroni NPY e AGRP. L'iniezione intravenosa di grelina nell'uomo, stimola l'assunzione di cibo e del senso della fame, attraverso l'interazione con i neuroni che si trovano nei nuclei arcuati dell'ipotalamo e che sono accessibili agli ormoni periferici. L'innalzamento prima di pranzo e la caduta dopo pranzo dei livelli plasmatici di grelina, e la correlazione con l'appetito, indicano che questo ormone potrebbe giocare, nell'uomo, un ruolo importante nell'assunzione di cibo. Al contrario della leptina e dell'insulina, che sono rilasciate in proporzione all'accumulo di grasso corporeo ed hanno effetti a lungo termine sull'omeostasi energetica, la grelina è responsabile degli effetti a breve termine in relazione ai pasti. Le concentrazioni circolanti di grelina sono inferiori negli uomini obesi, ma gli attuali studi sono in disaccordo sul fatto che l'assunzione di cibo sopprima o meno i livelli di grelina in questi individui.

Un altro ormone intestinale, il peptide YY3-36 (PYY), un agonista del recettore NPY Y2 che è espresso dai neuroni NPY nei nuclei arcuati, è rilasciato dopo pranzo in relazione al contenuto calorico del pasto. Le iniezioni di PYY diminuiscono la concentrazione di NPY ed incrementano l'attività neuronale POMC, riducendo l'assunzione di cibo nei roditori e negli umani.

La colecistochinina, che è rilasciata in risposta al grasso alimentare, migliora l'assorbimento del cibo, rallentando lo svuotamento gastrico, stimolando la contrazione della colecisti, inibendo l'assunzione di cibo durante il pasto attraverso il sistema afferente vagale. Il GLP-1, inibisce la motilità gastrointestinale, l'appetito e l'assunzione di cibo. La secrezione di un inibitore gastrico polipeptidico, l'ormone duodenale, non influisce sull'assunzione di cibo, ma favorisce l'obesità attraverso l'immagazzinamento dei vari nutrienti sotto forma di grassi.

Tante altre molecole, inclusi altri peptidi, neurotrasmettitori, citochine, ormoni steroidei ed enzimi, influenzano l'omeostasi energetica.

Considerando i lavori presenti in letteratura e i dati riportati, la nostra attenzione si è focalizzata in particolare sullo studio di alcuni dei componenti del circuito della melanocortina: POMC e MC4R.

In particolare il mio interesse in questi anni è stato rivolto al gene POMC.

La proopiomelanocortina umana (POMC) è una proteina di 267 aminoacidi sintetizzata nell'ipofisi, nel nucleo arcuato dell'ipotalamo, nel tratto solitario della medulla, nella pelle, nel sistema immune e in altri tessuti. Essa funge da precursore di numerosi altri peptidi biologicamente attivi derivati da un processing post-traduzionale operato da specifici enzimi, le proconvertasi 1 e 2 (PC1 e PC2), che riconoscono specifici siti di taglio. Questi peptidi includono l' α -, β - e γ -MSH, l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), le lipoproteine e la β -endorfina che hanno attività biologiche differenti a secondo del recettore della melanocortina al quale si legano. Sono stati individuati cinque recettori della melanocortina (MCRs) con cui essi interagiscono. L'MC1R è espresso nei melanociti e media gli effetti sulla pigmentazione della pelle e dei capelli. L'MC2R, espresso

soprattutto nella corteccia surrenalica, media gli effetti di ACTH sulla sintesi e il rilascio dei glucocorticoidi. L'MC3R e MC4R sono espressi nel cervello e soprattutto nelle aree coinvolte nella regolazione del bilancio energetico. L'MC3R è localizzato nell'ipotalamo e nel sistema limbico ed è altamente espresso dai neuroni arcuati, inclusi i neuroni di POMC. L'MC4R è più ampiamente distribuito nel cervello, nell'ipotalamo, nel talamo e nella corteccia. Esso è espresso soprattutto nel nucleo paraventricolare e nell'area ipotalamica laterale, che sono quelle più importanti nella regolazione del bilancio energetico. L'MC5R è espresso nelle ghiandole esocrine e nel muscolo scheletrico. L'alterazione o la distruzione di MC1R, MC2R e MC5R determina, rispettivamente, anomalie nella pigmentazione, nella produzione degli steroidi a livello del surrene, nella funzione delle ghiandole esocrine, ma non alterazioni nell'omeostasi energetica. Al contrario, MC3R e MC4R giocano un ruolo fondamentale nel bilancio energetico e quindi una loro alterazione o la loro assenza provoca uno scompenso nel bilancio energetico con conseguente iperfagia e obesità.

La β -endorfina e gli altri peptidi MSH sembrano avere effetti sulla regolazione neuroendocrina, sul dolore, sul comportamento e sulla funzione immune.

La prima diretta evidenza che il gene POMC e i suoi peptidi derivati siano coinvolti nel controllo dell'appetito deriva da uno studio in cui sono stati descritti due bambini affetti da iperfagia e obesità causate da difetti nel gene POMC. Il primo bambino aveva un difetto nella sintesi di ACTH e α -MSH, il secondo presentava un'alterazione nella sequenza che interferiva con la traduzione del gene POMC. A questo sono seguiti ulteriori studi condotti su POMC che hanno evidenziato altre alterazioni genetiche confermando così il legame tra questo gene e l'obesità nell'uomo e nel topo.

1.2 - La Sindrome Metabolica

È noto ormai da secoli che l'eccesso di grasso nel corpo possa determinare gravi conseguenze alla salute, ma solo nell'ultimo secolo l'obesità ha assunto un'importanza notevole nella sanità, suscitando un grande interesse da parte del mondo scientifico verso

lo studio e la comprensione dei meccanismi che sottendono questa che è una vera e propria malattia. Negli ultimi anni, l'obesità sembra sia stata classificata tra i principali fattori che determinano quella che prima era stata definita Sindrome X, poi Sindrome dell'insulino-resistenza e più di recente, Sindrome Metabolica.

Attualmente la sindrome è stata rinominata “plurimetabolica”, comprendendo l'associazione di insulino-resistenza, obesità centrale, diabete mellito di tipo 2, dislipidemia e ipertensione arteriosa. Molti studi epidemiologici hanno valutato i vari aspetti della sindrome metabolica valutandoli singolarmente, e solo alcuni di essi l'hanno considerata come un “cluster” di fattori di rischio.

1.2.1 - La definizione secondo la WHO

La sindrome metabolica, secondo la definizione proposta da *World Health Organization* (WHO) e poi modificata in parte da *European Group for Study of Insulin Resistance* (EGIR), è caratterizzata dai seguenti fattori di rischio:

- ***insulino-resistenza*** definita dalla presenza di iperinsulinemia e da elevati livelli di glucosio nel sangue a digiuno di almeno 110 mg/dL

e dalla presenza di almeno due dei seguenti criteri:

- ***obesità addominale*** definita sulla base di due definizioni:
 - secondo la definizione originale di WHO, è il rapporto vita-fianchi $>0,90$ o BMI ≥ 30 kg/m²;
 - secondo la modifica apportata da EGIR, è invece la circonferenza vita ≥ 94 cm;
- ***dislipidemia*** con trigliceridi nel siero ≥ 150 mg/dL (≥ 1.70 mmol/L) o con HDL colesterolo < 35 mg/dL ($< 0,90$ mmol/L);
- ***ipertensione*** che si basa su due definizioni:
 - secondo la definizione originale di WHO, in cui l'ipertensione deve essere $\geq 160/90$ mmHg;
 - secondo la modifica apportata da EGIR, la quale abbassa i valori di ipertensione a 140/90 mmHg.

1.2.2 - La definizione secondo la NCEP

La *NCEP Expert Panel* e la *NCEP Adult Treatment Panel (ATP III)* hanno pubblicato nel 2001 i criteri di diagnosi clinica che definiscono la sindrome metabolica come sindrome caratterizzata da tre o più dei seguenti fattori di rischio:

- **livelli di glucosio plasmatico a digiuno** di almeno 110 mg/dL ($\geq 6,10$ mmol/L);
- **elevati livelli di trigliceridi plasmatici** di almeno 150 mg/dL ($\geq 1,70$ mmol/L);
- **bassi livelli di HDL-colesterolo nel plasma** <40 mg/dL ($<1,04$ mmol/L) nell'uomo e <50 mg/dL ($<1,29$ mmol /L) nella donna;
- **elevati valori di pressione arteriosa sistolica** ≥ 130 mm/Hg e **diastolica** ≥ 85 mm/Hg;
- **circonferenza vita** >102 cm nell'uomo e >88 cm nella donna.

L'uso della circonferenza vita >94 cm è stato consigliato per uomini che potrebbero essere geneticamente predisposti alla insulino-resistenza.

Tali criteri sono stati riveduti nel 2004, in seguito a studi epidemiologici:

- ***livelli di glucosio plasmatico a digiuno*** di almeno 100 mg/dL (5.55 mmol/L);
- ***elevati livelli di trigliceridi plasmatici*** di almeno 150 mg/dL ($\geq 1,70$ mmol/L);
- ***bassi livelli di HDL-colesterolo nel plasma*** < 40 mg/dL ($< 1,04$ mmol/L) nell'uomo e < 50 mg/dL ($< 1,29$ mmol /L) nella donna;
- ***elevati valori di pressione arteriosa sistolica*** ≥ 130 mm/Hg e ***diastolica*** ≥ 85 mm/Hg;
- ***circonferenza vita*** > 94 cm nell'uomo e > 80 cm nella donna.

1.3 - Patologie legate alla sindrome metabolica

Il significato clinico della sindrome plurimetabolica acquista particolare rilevanza quando si considera che l'insieme dei disturbi metabolici tipici di tale sindrome sembra giocare un ruolo essenziale nella genesi della malattia cardiovascolare e del diabete mellito di tipo 2. In pazienti affetti da sindrome metabolica, non

solo vi è un'elevata incidenza di sviluppare tali patologie, ma anche un'elevata mortalità per cardiopatia ischemica.

1.3.1 - Sindrome plurimetabolica e aterosclerosi

Molte componenti della sindrome sono noti fattori di rischio cardiovascolare, tra cui l'ipertensione arteriosa, ipertrigliceridemia, bassi livelli di HDL-colesterolo, elevati livelli di LDL-colesterolo, che sono piccole molecole dense e facilmente ossidabili, e infine aumentati livelli di PAI-1 (l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1). Numerosi studi fisiopatologici hanno mostrato come l'aumento dei depositi di tessuto adiposo viscerale e il conseguente sviluppo di insulino-resistenza e iperinsulinemia siano importanti nella genesi della sindrome plurimetabolica e dell'aterosclerosi precoce. In particolare è stato dimostrato come l'insulina abbia un'azione negativa nei confronti della parete vasale, dei fattori di coagulazione, delle prostaglandine, dei lipidi plasmatici e della pressione arteriosa.

Nella sindrome plurimetabolica caratteristica importante assume l'assetto lipidico, detto dagli studiosi inglesi atherogenic lipoprotein

profile (ALP), che è caratterizzato da aumento di trigliceridi e VLDL, da ridotti livelli di HDL e da aumentati livelli di molecole di LDL piccole e dense e che rappresenta la forma di dislipidemia più frequente nella malattia cardiovascolare.

Infine l'iperinsulinemia si associa ad elevati livelli di pressione arteriosa a causa dell'effetto eccitatorio dell'insulina sull'attività del sistema nervoso simpatico così come all'azione antinatriuretica dell'ormone.

In conclusione la sindrome plurimetabolica può essere considerata una patologia preclinica che apre la strada all'insorgenza della malattia cardiovascolare aterosclerotica, la quale rappresenta oggi la principale causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati.

1.3.2 - Sindrome plurimetabolica e diabete mellito di tipo 2

I soggetti affetti da sindrome plurimetabolica, non soltanto hanno una maggiore tendenza a sviluppare la malattia cardiovascolare, ma hanno anche un maggiore rischio di ammalarsi di diabete di tipo 2. L'insulino-resistenza che si osserva nei pazienti affetti da sindrome metabolica riveste un ruolo fondamentale nell'eziologia del diabete

mellito di tipo 2. Il termine “insulino-resistenza” definisce la resistenza periferica o meglio la ridotta sensibilità delle cellule periferiche all’azione dell’insulina sull’utilizzazione del glucosio a livello dei tessuto adiposo e muscolare e ciò a seguito della diminuzione del numero dei recettori cellulari per l’insulina. Si ritiene oggi che la principale causa d’insorgenza di insulino-resistenza sia rappresentata dall’obesità.

La resistenza agli effetti dell’insulina, a livello dei tessuti periferici insulino-sensibili, di per sé, comporta un certo grado di iperglicemia, la quale è causa di una stimolazione funzionale sul pancreas che, di fronte a un aumento della glicemia, aumenta la produzione di insulina (iperinsulinemia compensatoria). Ciò mantiene, almeno inizialmente, normali i livelli plasmatici di glucosio. Nei soggetti predisposti, dopo un certo periodo, l’incapacità delle cellule β pancreatiche di continuare questa risposta di aumentato rilascio dell’ormone causa iperglicemia.

Negli ultimi anni sono stati individuati alcuni dei meccanismi molecolari e metabolici tramite cui l’aumentata massa di tessuto adiposo, che sta alla base dell’obesità, causa insulino-resistenza;

esistono inoltre molti argomenti a favore della possibilità che l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia, oltre ad essere causate dall'obesità, possano contribuire a loro volta allo sviluppo dell'obesità stessa.

Per quanto riguarda i meccanismi molecolari in pazienti obesi, sono state scoperte alterazioni della funzionalità del recettore insulinico con riduzione della capacità di trasferire il messaggio ormonale all'interno della cellula. Queste modificazioni recettoriali sarebbero dovute a un'alterata regolazione delle proteine che controllano la funzionalità del recettore, tra cui le più studiate sono: il tumor necrosis factor alpha (TNF- α), una citochina circolante prodotta dal tessuto adiposo, e la PC-1, una glicoproteina di membrana presente in diversi tessuti. Entrambe, riducendo la trasmissione del segnale insulinico e aumentando i loro livelli, si associano ad insulino-resistenza (13-14).

Inoltre gli alterati livelli di insulina producono una disfunzione del metabolismo dei lipidi. Nel soggetto normale, infatti, l'insulina stimola la produzione di acidi grassi e trigliceridi all'interno degli adipociti; essa svolge quindi un'attività lipogenica che favorisce la

formazione di tessuto adiposo (il quale rappresenta una buona riserva energetica), cioè inibisce la lipasi impedendo l'idrolisi dei trigliceridi immagazzinati nell'adipocita.

Queste azioni sono carenti nel diabetico, nel quale caratteristico è l'aumento dell'idrolisi dei trigliceridi, in quanto la lipasi non viene più correttamente inibita, con aumentata concentrazione di acidi grassi liberi (FFA) a livello del sistema portale e con conseguente aumento della sintesi di trigliceridi secreti dal fegato nelle VLDL. Le VLDL determinano la liberazione di particelle di lipoproteine IDL (lipoproteine a densità intermedia) che vengono convertite nel fegato in LDL, più ricche in colesterolo (15). Nel diabetico, quindi, caratteristica è l'ipertrigliceridemia.

1.4 - La patogenesi molecolare

La sindrome plurimetabolica è caratterizzata da un insieme di alterazioni metaboliche multiple; le ragioni alla base dell'aggregazione di tali alterazioni, nello stesso individuo, sono ancora largamente sconosciute. È sicuramente possibile che il manifestarsi di una di queste componenti possa facilitare lo

sviluppo delle altre e, da questo punto di vista, sia l'obesità sia l'insulino-resistenza sono considerate tra i principali fattori di rischio per lo sviluppo della sindrome (16).

Si ritiene oggi che lo sviluppo della sindrome metabolica sia dovuto da un lato all'interazione di fattori genetici e dall'altro a elementi ambientali, quali una scarsa attività fisica e una dieta ad alto contenuto di lipidi e carboidrati che promuovono, mantengono e/o peggiorano la sua espressione clinica.

1.4.1 - Fattori genetici e fattori ambientali

È necessario ricordare che, a differenza delle patologie che presentano una trasmissione mendeliana semplice, nelle quali vi è una relazione diretta tra il genotipo e la presenza o l'assenza della malattia, la sindrome plurimetabolica, così come altre malattie metaboliche con elevata frequenza, rappresenta un esempio di "fenotipo complesso" in cui il quadro patologico è il risultato dell'interazione di molteplici fattori. Gli studi finora condotti hanno dimostrato in maniera convincente che il genotipo influenza, almeno in parte, l'insorgenza della sindrome metabolica, che

esistono famiglie a più alto rischio per questa patologia. Molti fenotipi, infatti, sono il risultato di alterazioni di specifici geni. È altresì vero che l'azione di una singola variante genica è quasi sempre associata all'effetto di interazioni tra geni diversi e di interazioni genotipo-ambiente. Ovviamente sono necessarie ulteriori ricerche che, attraverso lo studio contemporaneo di più markers polimorfici e l'utilizzo di modelli animali transgenici, consentano di definire meglio le varianti genetiche capaci, insieme ai convenzionali fattori di rischio, di predire il rischio individuale a sviluppare la sindrome. Lo scopo di questo screening è quello di poter prevenire, o ritardare, la comparsa dei sintomi attraverso programmi di educazione sanitaria rivolti proprio ai gruppi di rischio. Per spiegare l'importanza dei fattori genetici è indicativo introdurre il concetto di "gene di suscettibilità". Tali geni aumentano il rischio di sviluppare un determinato fenotipo, ma da soli non sono sufficienti a spiegare l'insorgenza della malattia. Accanto a questi alleli di predisposizione rari, vi è la possibile esistenza di alleli comuni che hanno implicazioni rilevanti riguardo l'identificazione di soggetti a rischio in una grossa parte della

popolazione. È molto probabile che il quadro clinico della sindrome sia modulato anche da interazioni genotipo-ambiente; di conseguenza, il genotipo predispone il soggetto, conferendogli una certa sensibilità a fattori ambientali quali il contenuto di grassi nella dieta, l'apporto calorico, il fumo, il consumo di alcolici, l'attività fisica e altri ancora, con conseguente incremento del rischio di provocare le tipiche alterazioni metaboliche della sindrome. Sono rilevanti, inoltre, anche le interazioni tra geni diversi, nonostante gli studi su questo particolare aspetto siano ancora in fase di sviluppo (17).

1.4.2 - Interazione genotipo-ambiente nello sviluppo della sindrome metabolica

Come già accennato precedentemente, nel valutare l'insieme delle alterazioni della sindrome metabolica, si deve considerare l'importanza delle interazioni tra fattori genetici e fattori ambientali, tra cui l'apporto calorico e l'attività fisica.

a) L'alimentazione

È ormai accertato che l'obesità, una delle principali componenti che caratterizzano la sindrome metabolica, proprio perché indotta da uno squilibrio tra introito e consumo energetico, si sviluppa nei soggetti geneticamente predisposti in concomitanza di uno stile di vita sedentario e di una dieta a elevato contenuto calorico. Per ciò che riguarda l'alimentazione, è stato dimostrato che il contenuto calorico degli alimenti gioca un ruolo importante nella regolazione dell'assunzione di cibo e che le caratteristiche specifiche dei vari macronutrienti possono influenzare in modo rilevante le variazioni di peso corporeo. Mettendo a confronto diete di diverso contenuto di macronutrienti, è stato osservato che un'alimentazione ricca di grassi stimola una maggiore assunzione di cibo e, quindi di calorie rispetto a diete a basso contenuto calorico o a base di proteine e carboidrati. Questo fenomeno, definito come “sovracconsumo passivo”, dipende in parte dal fatto che i grassi saziano meno dei carboidrati e delle proteine (18).

Bisogna comunque tenere presente che la risposta ad un regime di iperalimentazione varia da individuo a individuo.

b) L'attività fisica

La dieta ricca di grassi non è il solo fattore ambientale responsabile dell'insorgenza di sindrome metabolica, ma sono stati chiamati in causa diversi fattori, tra cui la ridotta attività fisica giornaliera che induce un rallentamento della capacità del muscolo di ossidare i grassi, promuovendo, invece, l'accumulo di grasso corporeo se l'individuo indulge in una dieta ricca di lipidi.

È stato inoltre dimostrato che coloro che intraprendono e mantengono un buon livello di attività fisica hanno più probabilità di mantenere il peso forma raggiunto e che, inoltre, l'attività fisica determina il miglioramento di numerose alterazioni che costituiscono la sindrome plurimetabolica. Sebbene gli effetti maggiori si osservino con un'attività fisica costante, alcune modificazioni si ottengono anche dopo interventi di breve durata come, ad esempio, venti settimane di attività sportiva intensa (19).

1.5 - Le Adipocitochine

Recenti scoperte, nella biologia dell'adipocita, hanno dimostrato come il tessuto adiposo bianco abbia funzioni autocrine, paracrine ed endocrine (20-21). Si sa, infatti, che questo tipo di cellula è più di un semplice deposito di lipidi; gli adipociti secernono numerosi importanti fattori circolanti, tra i quali il TNF- α , l'IL-6, l'angiotensina, il PAI-1, la leptina, l'adiponectina e la resistina oltre ad essere la maggiore sorgente per la produzione endogena di acidi grassi non esterificati (i NEFA) tramite lipolisi. Questi fattori potrebbero indurre insulino-resistenza o altre complicanze dell'obesità.

Negli ultimi anni, è sempre più forte la convinzione che il tessuto adiposo sia un organo endocrino altamente attivo secernente una serie di ormoni che intervengono nella regolazione del metabolismo energetico.

La Leptina

Sintetizzata e rilasciata nel torrente circolatorio dagli adipociti, la leptina è un segnale di natura ormonale che informa il sistema

nervoso centrale sullo stato delle riserve energetiche dell'individuo. E' presente in circolo in concentrazioni direttamente proporzionali alle riserve di grasso e, in condizioni di equilibrio metabolico, rappresenta un importante segnale dello stato nutrizionale per il sistema nervoso centrale. Essa, tuttavia, è anche in grado di rispondere a modificazioni acute delle riserve energetiche dell'organismo, tipicamente rappresentate dall'assunzione di cibo e dal digiuno, in modo indipendente dalle riserve adipose.

La leptina svolge quindi la funzione di sensore del bilancio energetico preposto al mantenimento dell'omeostasi.

La leptina esplica la sua azione mediante l'interazione con specifici recettori che appartengono alla famiglia dei recettori delle citochine di I classe distribuiti ubiquitariamente nel corpo, indicando un ruolo generale della leptina che non è ancora ben chiaro. Sono state identificate diverse isoforme del recettore della leptina (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd e Ob-Re): l'Ob-Ra è considerato il trasportatore della leptina; l'Ob-Re è la forma solubile del recettore transmembrana della leptina. L' Ob-Rb è la forma lunga contenente un dominio intracellulare, presente ad elevate concentrazioni nei

centri della fame dell'ipotalamo, che attraverso la leptina informa il sistema nervoso centrale sui depositi di grasso del corpo. Essa ha un'azione anoressizzante stimolando sia la secrezione del CRH, potente inibitore dello stimolo della fame, sia il sistema della melanocortina, entrambe dotate della medesima azione, poiché inibiscono al contempo la sintesi e il rilascio del neuropeptide Y (NPY).

La scoperta della leptina nel 1994 e del suo gene codificante, vale a dire il gene ob (obeso), ha portato ad interessanti ricerche sull'obesità nell'uomo (22).

Alcuni studi riguardanti l'obesità effettuati su modelli animali omozigoti, per esempio ob/ob e db/db, hanno suggerito che sia la carenza di leptina sia la resistenza alla leptina, con conseguente iperleptinemia, possono essere causa di obesità (23-24). È vero anche che l'obesità nell'uomo è più complessa di quella degli animali omozigoti, poiché è una condizione poligenetica fortemente influenzata dalla dieta e dai fattori comportamentali (17). Le prime valutazioni delle concentrazioni plasmatiche di leptina nell'uomo

hanno mostrato come essa sia positivamente associata al sovrappeso (25-26); ciò venne anche confermato da studi epidemiologici.

Riassumendo, i bassi livelli di leptina in circolo, dovuti alla mutazione del gene *ob*, sono causa di iperfagia e obesità nella cavia *ob/ob* (omozigote per la mutazione), come pure l'alterazione del suo recettore è responsabile del genotipo obeso del ratto *db/db* e del ratto Zucker *fa/fa* (27).

Il fatto che molti soggetti obesi presentino livelli di leptina più elevati rispetto a quelli normopeso suggerisce che, nell'uomo, l'obesità è legata a una resistenza all'azione della leptina a livello dei centri ipotalamici piuttosto che a un suo deficit secretorio. Proprio per questo motivo alcuni ricercatori hanno supposto che l'iperleptinemia possa configurarsi come una componente aggiuntiva della sindrome metabolica; per cui, oltre alla presenza di ipertrigliceridemia, elevati livelli di glucosio, insulino-resistenza, ipertensione arteriosa e obesità, ipotizzano che la leptina sia molto più che un semplice indicatore di obesità (28).

La scoperta degli effetti della leptina nelle cavie aveva fatto ipotizzare un suo impiego terapeutico nell'obesità umana; ma i

risultati iniziali provenienti dai trials clinici sono stati alquanto deludenti, poiché l'ormone induce una modesta riduzione del peso corporeo solo se somministrata ad alte dosi.

L'Adiponectina

L'adiponectina, prodotta dagli adipociti, gioca un ruolo importante nell'omeostasi del glucosio e dei lipidi. Essa ha una struttura modulare che comprende un dominio N-terminale simil-collagene e un dominio globulare C-terminale molto simile nella struttura e nella sequenza al fattore C1q del complemento. L'adiponectina si assembla in trimeri che poi oligomerizzano a formare polimeri composti da 3 a 6 trimeri mediante l'interazione tra le regioni simil-collagene. La sua produzione avviene durante la differenziazione degli adipociti e la sua secrezione è stimolata dall'insulina. Sono stati individuati e clonati due recettori specifici per l'adiponectina, AdipoR1, prodotto soprattutto nel muscolo scheletrico, e AdipoR2, trovato nei tessuti epatici.

Una delle caratteristiche più interessanti dell'adiponectina è che, in contrasto con le altre adipocitochine le quali sono up-regolate in

caso di obesità, la sua espressione nel tessuto adiposo e la sua concentrazione plasmatica sono ridotte nei soggetti in soprappeso o obesi.

I livelli di adiponectina si abbassano invece in presenza di insulino-resistenza e di iperinsulinemia, pazienti con diabete di tipo II presentano infatti basse concentrazioni della proteina. I meccanismi attraverso i quali lo stato di insulino-resistenza sia associato a bassi livelli di adiponectina ancora non sono ben chiari. La sintesi e la secrezione dell'adiponectina sembrano regolate da diversi meccanismi. Piccoli adipociti producono ormoni insulino-sensibili, adiponectina, leptina ed altri ormoni. L'ipertrofia di queste cellule (larghi adipociti), indotta da una dieta ricca in grassi, causa una diminuzione nella produzione e nella secrezione dell'ormone insulino-sensibile e aumenta quello insulino-resistente, portando una insulino-resistenza nell'obesità. Il TNF- α , che è aumentato nel WAT dei soggetti obesi, sembra inibire la produzione di adiponectina. È stato dimostrato inoltre che essa diminuisce la produzione e gli effetti biologici del TNF α da parte dei monociti/macrofagi. L'adiponectina gioca quindi anche ruoli

antiaterogenici e antinfiammatori. Le azioni anti-infiammatorie dell'adiponectina si manifestano anche attraverso l'inibizione della produzione di IL-6 e l'induzione delle citochine anti-infiammatorie IL-10 e l'antagonista del recettore IL-1. Inoltre, l'adiponectina riduce l'induzione delle molecole di adesione endoteliale ICAM-1 e VCAM-1 mediante il TNF- α .

Tutto questo fa pensare che questa citochina potrebbe avere un ruolo antinfiammatorio e antiaterogenico, soprattutto nelle cellule endoteliali e nei macrofagi, avendo così un ruolo protettivo nei processi aterosclerotici. Basse concentrazioni plasmatiche della proteina sono riportate nella malattia coronarica, associata ad altri fattori di rischio quali sesso maschile, alta pressione sanguigna, obesità e diabete mellito di tipo II. L'effetto antinfiammatorio dell'adiponectina indica che è un interessante fattore protettivo per lo sviluppo dell'aterosclerosi.

La Resistina

La resistina è prodotta nel tessuto adiposo e sembra antagonizzare l'azione dell'insulina. Essa è aumentata nel diabete di tipo II

suggerendo un legame tra l'obesità e l'insulino-resistenza, anche se il suo ruolo è ancora controverso e poco chiaro. Sono state trovate più alte concentrazioni di resistina negli obesi piuttosto che nei soggetti normali.

Si tratta di un nuovo ormone identificato da Stepan e coll. nel 2001 (29). E' stata scoperta cercando di spiegare come i tiazolidinedioni (TZD), agendo su PPAR- γ negli adipociti, possono aumentare l'uptake del glucosio nella cellula. E' stato fatto uno screening sulle 3T3-L1 per identificare uno o più geni che venivano up-regolati durante il differenziamento adipocitario e down-regolati dopo trattamento con rosiglitazone.

Appartiene ad una famiglia di tre proteine: le RELMs (resistin-like molecole). RELM- α , nota anche come FIZZ-1 (found in inflammatory zone), si trova a livello del polmone, mentre RELM- β , o FIZZ-3, viene espressa nell'intestino (30).

E' composta di un dominio ricco in cisteina e potrebbe potenzialmente prendere parte a interazioni proteina-proteina. Viene sintetizzata dal tessuto adiposo e secreta nel medium di incubazione di cellule adipose. Tale proteina sembrava in grado di

indurre una parziale diminuzione dell'uptake di glucosio indotto dall'insulina in cellule adipose. Venne ipotizzato all'inizio che l'espressione della resistina negli adipociti venisse marcatamente ridotta sia in *vivo* che in *vitro* dai TZD. In seguito, Way e coll. (31) hanno dimostrato che in realtà l'espressione della resistina è marcatamente inibita nel tessuto adiposo di ratti e topi geneticamente obesi. Inoltre, i TZD ne aumenterebbero significativamente l'espressione e i livelli circolanti. Questi dati rimetterebbero in seria discussione il ruolo svolto della resistina nella patogenesi dell'insulino-resistenza. Infatti, Kim e coll. (32) hanno dimostrato che il livello di RNA messaggero della resistina negli adipociti è molto basso durante il digiuno aumentando di 25 volte nei topi a digiuno rialimentati con una dieta ad alto contenuto in carboidrati. Tale livello nel tessuto adiposo è estremamente ridotto anche negli animali resi diabetici dall'infusione di streptozotocina e aumentato in questi di ben 23 volte dopo infusione di insulina. Un dato interessante fornito da quest'ultimo gruppo di ricerca è che durante il trattamento con medium condizionato, ottenuto da colture di cellule COS trasfettate con il vettore di

espressione della resistina, la trasformazione delle cellule 3T3-L1 in adipociti bianchi maturi viene inibita dell'80%. Dunque, la sua espressione negli adipociti, il marcato aumento durante le fasi avanzate dell'adipogenesi, e la notevole induzione durante la rialimentazione dopo digiuno e dopo infusione di insulina a topi a cui è stato indotto chimicamente diabete suggeriscono che questo fattore possa essere coinvolto nel monitorare come un sensore lo stato nutrizionale dell'animale per regolare l'adipogenesi. Alcune di queste proprietà sono molto simili a quelle osservate con la leptina, che viene secreta solo dagli adipociti ed è indotta dalla rialimentazione dopo digiuno e dall'insulina. Si può, dunque, ipotizzare che la resistina sia una specie di segnale a feed-back per limitare la formazione di tessuto adiposo. Questa funzione potrebbe essere del resto coinvolta nell'insorgenza di insulino-resistenza: infatti, l'inibizione dell'adipogenesi, che si accompagna a un minor numero di nuovi adipociti di piccolo volume e più sensibili all'insulina, è tipica di molte lipodistrofie caratterizzate, sia nell'animale che nell'uomo, da un'insulino-resistenza di grado estremamente marcato.

Recentemente, è stato pubblicato il lavoro condotto su topi knockout per la resistina che confermerebbe la funzione fisiologica di questa proteina nel mantenere i livelli di glucosio nel sangue durante il digiuno, suggerendone il suo ruolo nel mediare l'iperglicemia e l'obesità (33).

Per quanto riguarda l'uomo, sono stati condotti studi di due tipi: da una parte, studi genetici per analizzare l'associazione del locus umano della resistina con il diabete o l'obesità e dall'altra, studi sull'espressione genica e proteica della resistina. Anche in questo caso la letteratura è divisa tra i dati ottenuti in favore o contro il ruolo della resistina in caso di obesità o diabete nell'uomo (34).

Il Fattore di necrosi tumorale alpha (TNF- α)

Il TNF- α è una citochina presente in alcune cellule del sistema immunitario tra cui i macrofagi attivati, nel tessuto adiposo e nel tessuto muscolare scheletrico. Si tratta di una proteina transmembranale di 26-kDa che viene tagliata in una proteina biologicamente attiva di 17-kDa, la quale esplica le sue funzioni interagendo con due tipi di recettori, il recettore di tipo 1 (TNFR-1)

e il recettore di tipo 2 (TNFR-2) (20, 35). Il TNF- α è stato il primo prodotto secreto dal tessuto adiposo ad essere proposto nel rappresentare un legame molecolare tra obesità e insulino-resistenza (36). In particolare, il TNF- α è in grado di inibire il differenziamento degli adipociti riducendo l'espressione di fattori di trascrizione PPAR- γ e CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) (37); inoltre, può indurre un'alterazione del metabolismo glucidico e lipidico mediante la soppressione dell'espressione di geni specifici per gli adipociti, quali LPL, il glicerol-3-fosfato-deidrogenasi, il trasportatore di glucosio GLUT-4 e AP2. Infine, il TNF- α potrebbe provocare insulino-resistenza, sebbene le conseguenze metaboliche di quest'effetto siano poco rilevanti nell'uomo rispetto ad altre specie animali.

Recentemente sono stati descritti i meccanismi dell'insulino-resistenza causata dal TNF- α (38). Da un lato, sembra che il TNF- α possa agire direttamente sulle vie di trasduzione del segnale dell'insulina inibendo l'attività tirosin-chinasica del recettore dell'insulina (IRS), dall'altro il TNF- α potrebbe causare

indirettamente l'insulino-resistenza provocando un incremento della lipolisi e dei livelli plasmatici dei NEFA (39-40).

È stato inoltre suggerito che il TNF- α gioca un ruolo importante nella patogenesi dell'insulino-resistenza correlata all'obesità; infatti, nei modelli animali di obesità è stata osservata una sovraespressione di mRNA per il TNF- α a livello del tessuto adiposo (41). In ratti Zucker geneticamente obesi è possibile indurre un incremento della sensibilità all'insulina mediante la neutralizzazione genetica con anticorpi per il TNF- α (42) o con l'uso di terapia farmacologica del TNF- α .

Risulta meno chiaro il ruolo del TNF- α nella patogenesi dell'insulino-resistenza sistemica correlata all'obesità nell'uomo. Infatti, nell'uomo, l'impiego potenziale di una terapia anti-TNF- α come trattamento per l'insulino-resistenza non è stato avvalorato dagli effetti ottenuti dopo una singola somministrazione di una proteina di infusione, il TNF α -Fc, a sette pazienti insulino-resistenti. In tali pazienti non è stato riscontrato alcun incremento della responsività all'insulina (43).

Diversi autori hanno studiato gli effetti del TNF- α sul metabolismo del glucosio nel muscolo scheletrico, dimostrando che il TNF- α , sia ad elevate sia a basse concentrazioni, non interferisce con l'uptake del glucosio insulino-stimolato o insulino-dipendente (44); anzi, sorprendentemente, è stato dimostrato che il TNF- α è in grado di stimolare tale captazione (45).

In conclusione, il TNF- α provoca alterazioni nella risposta all'insulina nel tessuto adiposo, ma non nel muscolo scheletrico. L'espressione di TNF- α è maggiore nei roditori e forse anche in soggetti umani obesi, ma i livelli plasmatici sono probabilmente troppo bassi per poter esercitare una funzione endocrina significativa. E' stato suggerito che il ruolo del TNF- α nell'uomo sia di mediare un effetto autocrino o paracrino sul glucosio presente negli adipociti, sul metabolismo dei grassi e sul differenziamento degli adipociti.

L'Interleuchina-6 (IL-6)

L'IL-6 è un'importante citochina liberata in corso di fase acuta nella risposta infiammatoria e secreta principalmente dai macrofagi attivati e dai linfociti.

Recenti studi hanno permesso di evidenziare come il tessuto adiposo sia in grado di produrre più di un terzo della IL-6 circolante (13) e come l'IL-6 sia maggiormente espressa nel tessuto adiposo viscerale e in misura minore in quello sottocutaneo (46). Gli stessi ricercatori hanno anche proposto che l'IL-6, attraverso l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, potrebbe provocare i sintomi caratteristici della sindrome metabolica (47). Infatti, tale citochina incrementa la secrezione di CRH, la produzione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) e di cortisolo predisponendo gli individui all'obesità centrale, all'insulino-resistenza e alla dislipidemia (48-49).

Nei ratti, l'IL-6 aumenta la secrezione di trigliceridi epatici e quindi può contribuire all'insorgenza di ipertrigliceridemia associata all'adiposità viscerale e all'alterazione del metabolismo glucidico,

favorendo un incremento dose-dipendente sia dei livelli di glucosio nel sangue a digiuno che di livelli plasmatici di glucagone (50).

L'IL-6, così come il TNF- α , potrebbe indurre insulino-resistenza attraverso un meccanismo indiretto, vale a dire, stimolando la lipolisi (51-52).

Esistono quindi evidenze che associano elevati livelli di IL-6 con l'obesità, rimane tuttavia sconosciuta l'importanza di questa correlazione nella patogenesi della sindrome metabolica.

L'Inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1)

L'indebolimento del sistema della fibrinolisi partecipa alle complicazioni cardiovascolari legate all'obesità. Questo effetto è stato collegato alle elevate concentrazioni di PAI-1, un inibitore fisiologico primario della fibrinolisi (36).

Il PAI-1 è espresso principalmente dalle cellule epatiche ed endoteliali, ma è stato trovato anche nel tessuto adiposo dei roditori e dell'uomo. Studi *in vitro* hanno confermato che il tessuto adiposo omentale produce una quantità maggiore di PAI-1 rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo umano (53).

È stato osservato che l'aumento dei livelli plasmatici di PAI-1 è fortemente correlato ad un gruppo di variabili associate alla sindrome metabolica, comprendenti il rapporto vita-fianchi e le misure dirette del grasso viscerale (54).

L'Angiotensina

L'ipertensione è un disturbo frequente dell'obesità e rappresenta un rischio maggiore per lo sviluppo delle malattie cardiovascolari.

L'incremento dell'attività del sistema renina-angiotensina (RAS) potrebbe avere un ruolo importante nell'eziologia dell'ipertensione correlata all'obesità. Infatti, nei soggetti obesi si osserva un aumento sia dell'attività plasmatica della renina e dell'aldosterone che dei livelli circolanti di angiotensinogeno (55); inoltre, i geni che codificano per l'angiotensinogeno, per l'enzima che converte l'angiotensinogeno in angiotensina (ACE) e per il recettore dell'angiotensina di tipo 1, sono espressi abbondantemente nel tessuto adiposo murino e umano. Queste osservazioni potrebbero indurre a costituire un'ipotesi secondo cui l'aumento dell'attività del RAS negli adipociti può contribuire a definire un meccanismo

di ipertensione, obesità correlata, associata alla sindrome metabolica.

È necessario dire, inoltre, che l'espressione dell'angiotensinogeno negli adipociti è stimolata dall'aumento della massa adiposa (56) e che, infine, l'angiotensinogeno è espresso nelle diverse regioni del tessuto adiposo in modo differente. Infatti, i livelli di mRNA sono più elevati nel tessuto adiposo viscerale che in quello sottocutaneo (57). Sono, tuttavia, necessari studi più approfonditi al fine di chiarire l'importanza del RAS del tessuto adiposo nella patogenesi dell'insulino-resistenza e di altri sintomi caratteristici della sindrome metabolica.

Cap. 2 - Scopo

Sulla base dei dati presenti in letteratura e considerando i meccanismi sinteticamente sopra delineati per l'obesità e per la sindrome metabolica, il progetto di tesi si propone due obiettivi:

1. Caratterizzare geneticamente un elevato numero di pazienti adulti severamente obesi ($BMI > 40$) provenienti dall'area campana a livello del gene POMC, connesso alla regolazione del peso corporeo, al fine di individuare, dopo il confronto con una popolazione di soggetti normopeso ($BMI < 25$), mutazioni e/o polimorfismi che potrebbero essere coinvolti nell'insorgenza dell'obesità e rappresentare un bersaglio per terapie innovative.
2. Selezionare un gruppo di circa 200 pazienti obesi affetti e non da sindrome metabolica e determinare i livelli di leptina, adiponectina, resistina per valutare eventuali differenze nell'ambito del gruppo stesso e rispetto alla popolazione normale. Inoltre, dosare nel siero di questi pazienti la proteina C-reattiva, la ferritina, le LDL ossidate e gli anticorpi contro le LDL ossidate per valutare lo stato

infiammatorio, ossidativo e il rischio di aterosclerosi presenti
in corso di sindrome metabolica.

Cap. 3 - Materiali e metodi

3.1 - Soggetti

La popolazione in studio era costituita da 196 (111 femmine: 56.6%; 85 maschi: 43.4%) pazienti severamente obesi non imparentati, di età compresa tra i 17 e 70 anni, reclutati dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università “Federico II” di Napoli. Tutti i soggetti erano caucasici e vivevano in Italia da oltre tre generazioni, eccetto una donna africana di 28 anni residente in Italia da più di venti anni. I criteri di inclusione erano: assenza di diabete trattato, assenza di malattie coronariche, assenza di ipertensione trattata e presenza di obesità grave (BMI>40 kg/m²). Per tutti i soggetti erano valutati i seguenti parametri: BMI, circonferenza vita e fianchi (in cm), massa grassa e magra mediante impedenziometria (58) (STA/BIA Akern, Milano, Italia). Le caratteristiche generali della popolazione obesa studiata sono riportate nella Tabella 1. Un totale di 91.2% di soggetti obesi avevano una storia familiare di: 26.3% obesità, 42.1% obesità + ipertensione + diabete, 14% ipertensione, 5.3% diabete, 2.3% iperlipidemia e 1.2% neoplasia. Inoltre, una popolazione di

controllo costituita da 100 (34 maschi e 66 femmine) soggetti normopeso ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$, range di età: 26-76 anni) reclutati dall'ambulatorio di Medicina di Laboratorio, è stata analizzata geneticamente per l'obesità ed è servita per calcolare i valori di riferimento per i livelli di leptina, adiponectina e resistina sierica. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato allo studio. La ricerca è stata condotta in accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki II.

Tabella 1. Caratteristiche generali e biochimiche dei pazienti severamente obesi (media e deviazione standard)

	Maschi	Femmine
N	85	111
Età, anni	32.3 (10.5)	32.4 (12.5)
BMI, kg/m²	48.2 (8.3)	49.3 (8.1)
Waist-to-hip ratio	1 (0.06) ^a	0.96 (0.07)
Massa magra,^b %	56.9 (5.4) ^a	48.3 (6.0)
Massa grassa,^b %	43.1 (5.5) ^a	51.7 (6.8)
Pressione sistolica, mmHg	134.1 (16) ^a	123.2 (16)
Pressione diastolica, mmHg	85.9 (10) ^a	79.3 (10)
Battito cardiaco, battiti/min	79.8 (12)	78.8 (10)
Colesterolo totale, mmol/L	4.5 (0.8) ^a	4.9 (1.0)
Colesterolo HDL, mmol/L	1.0 (0.2) ^a	1.2 (0.2)
Colesterolo LDL, mmol/L	2.8 (0.8)	3.0 (0.9)
Trigliceridi, mmol/L	1.7 (1.1)	1.5 (0.6)
AST, U/L	29.9 (13.0) ^c	24.6 (14.2)
ALT, U/L	52.6 (31.5) ^a	32.1 (22.3)
Insulina, mIU/L	26.9 (18.5) ^c	20.3 (9.5)
Glucosio, mmol/L	5.4 (1.8)	5.1 (0.8)
HOMA	6.5 (4.4) ^a	4.6 (2.4)
TSH, mIU/L	1.7 (0.8)	2.3 (2.5)
FT3, ng/L	2.9 (0.5)	2.9 (0.5)
FT4, ng/L	62 (51)	59 (53)
ACTH, ng/L	39.9 (37.7)	24.4 (11.1)
Cortisolo, µg/L	136.7 (44.8)	133.2 (59.8)

a $P < 0.001$.

b Misurate in 86 pazienti (39 maschi e 47 femmine).

c $P < 0.05$.

3.1.1 - Amplificazione del DNA genomico e sequenziamento

Il DNA genomico degli obesi e dei soggetti controllo è stato estratto da sangue totale (Nucleon BACC-2, Amersham Biosciences

Europe, Milano, Italia). Le sequenze codificanti di POMC sono state amplificate utilizzando primers disegnati mediante il programma PRIMER 3 v 0.2, selezionati per generare frammenti che coprissero l'esone 1 e 2 per intero, e per ottenere dei frammenti sovrapposti per coprire tutto l'esone 3.

Il gene POMC è stato amplificato (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystem, Foster City, CA) in un volume finale di 25 μ l, contenente una mix (10 μ M of ogni primer, 1x PCR buffer, 200 μ M ogni dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) e 100 ng di DNA genomico. In Tabella 2 sono mostrate le condizioni di PCR.

I frammenti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5%, i prodotti di PCR sono stati poi purificati e sequenziati su entrambi i filamenti usando il kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing su ABI-Prism 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I nucleotidi e gli aminoacidi di POMC sono numerati in accordo alla sequenza di riferimento (GenBank accession numbers, V01510 e NP_000930).

Tabella 2. Primers e condizioni di PCR

<i>Ampliconi</i>	<i>Primer (5'-3')</i>	<i>bp</i>	<i>Temperatura di annealing (°C)</i>	<i>N° cicli</i>
Estone 1	F- GTGCTGCCGGGAAGGTCAAA R- GGACCGCGGAGAGCCAGAGG	287	62	35
Estone 2	F- CACCTCCTTTCTCAGCATTG R- CCCACACCCTTTTCTTTTGA	385	56	35
Estone 3				
Frammento A	F- GTCTTCCCCCAGGAGTGC R- CAGTCAGCTCCCTCTTGA ACT	424	60	35
Frammento B	F- GCAAGCGCTCCTACTCCAT R- CGATCCATGCTGCTGTTATTT	639	60	35

3.1.2 - Analisi mediante HPLC

Per analizzare l'inserzione di 9- e 18-bp (codone 93-99) nell'esone 3 del gene POMC abbiamo disegnato dei primers di amplificazione mediante il programma PRIMER 3 (F: 5'-GTCTTCCCCCAGGAGTGC-3' and R: 5'-AGACGTCCTCGCGCTTCT-3'). L'analisi è stata eseguita seguendo le procedure standard del WAVE DNA fragment Analysis System (3500 HT; Transgenomic, Cheshire, UK).

3.1.3 - Protein Truncation Test

Per verificare la presenza della mutazione E244X nell'esone 3 di POMC abbiamo utilizzato il protein truncation test che prevede l'aggiunta di 5 µl del prodotto di PCR e 1 µl di [³H] Leu ad un lisato di reticolociti (Promega, Madison, USA). Il primer upstream contiene segnali eucariotici per una trascrizione ed una traduzione efficiente (il promotore T7 e il sito di inizio di trascrizione). Gli oligonucleotidi usati per l'amplificazione del frammento B erano: 5'-T7-GAGTGCATCCGGGCCTGCAAG-3' e 3'UTR: 5'-CGATCCATGCTGCTGTTATTT -3'. Le condizioni per la PCR erano le seguenti: 1 ciclo a 94 °C (5 min), 35 cicli a 94 °C (30 sec), 60 °C (30 sec), 72 °C (45 sec) e 10 min di allungamento finale a 72 °C. Il peso molecolare dei prodotti di PCR (wild type e mutato) veniva verificato mediante elettroforesi su un gel di agarosio al 5%. Un'aliquota di 9 µl dei prodotti di reazione era denaturata con 3 µl di loading buffer e caricato su un gel SDS di poliacrilammide al 15%. I pesi molecolari dei due frammenti sono stati assegnati confrontandoli con uno standard SDS-PAGE (range 6.9–205 kDa) (Kaleidoscope Prestained Standard, Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA) analizzato nelle stesse condizioni sperimentali. Infine, il gel è stato fissato, seccato e autoradiografato.

3.1.4 - Analisi biochimiche

Le concentrazioni sieriche della leptina, adiponectina e resistina sono state misurate in duplicato negli obesi e nei soggetti di controllo mediante un dosaggio immunoenzimatico (ELISA kit Linco Research, St. Charles, MO).

La determinazione quantitativa della ferritina è stata ottenuta utilizzando un test immunoturbidimetrico impiegando analizzatori automatici di chimica clinica (Roche).

La proteina C-reattiva ad alta sensibilità è stata dosata con un test in nefelometria (Dade Behring).

Le LDL ossidate e gli anticorpi contro le LDL ossidate sono stati dosati nei sieri dei pazienti con test ELISA non competitivo (Mercodia, per le prime e Alfa-Wassermann, per i secondi).

Le concentrazioni di colesterolo totale e di trigliceridi sono stati misurati con i classici metodi enzimatici (59, 60). Le HDL sono state misurate dopo precipitazione delle LDL e le LDL sono state

calcolate con la formula di Friedewald. I livelli di TSH, FT3 e FT4 sono stati valutati mediante dosaggio immunoenzimatico (Abbot Laboratories, Rome, Italy). I livelli di insulina sierica, cortisolo e ACTH sono stati determinati mediante chemiluminiscenza (Immilight 2000, Medical System, Genova, Italy).

I livelli di glucosio sono stati misurati con il metodo dell'esochinasi. In ogni soggetto, il grado di insulino-resistenza è stato misurato considerando l'HOMA (homeostasis model assessment, secondo la formula $\text{insulina (mIU/L)} / [22.5 \times e^{-\ln(\text{glucose, in mmol/L})}]$ (61). L'attività transaminasica è stata determinata con il metodo IFCC.

3.1.5 - Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite con il pacchetto SPSS per Windows, versione 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Le variabili continue sono riportate come media e deviazione standard, le variabili categoriche sono riportate come percentuale.

Le variabili che non sono distribuite normalmente sono state trasformate logaritmicamente prima dell'analisi. Gli intervalli di

riferimento sono stati calcolati con il metodo dei percentili per le variabili non distribuite normalmente.

Confronti tra le variabili nei maschi e nelle femmine sono stati eseguiti usando il “T” test, per le variabili distribuite normalmente, il test “U di Mann-Whitney”, per quelle distribuite in modo non normale, o il “ χ^2 ” test, per le variabili categoriche. Le differenze tra i gruppi erano considerate statisticamente significative ad un $p < 0.05$.

3.1.6 - Studio di predizione della struttura proteica

Abbiamo effettuato uno studio di predizione della struttura secondaria del peptide mutato β -MSH usando il programma GOR 4, e utilizzando PSI-BLAST multiple sequence (62) per l’allineamento della sequenza proteica β -MSH.

3.1.7 – Presenza della sindrome metabolica

La sindrome metabolica (SM) è stata valutata secondo i criteri ATP III 2001 e 2004 considerando la sindrome presente se per 3/5 dei

critéri erano presenti valori superiori o inferiori (HDL) ai cut-off indicati (Tabella 3).

Tabella 3. Valori cut-off indicati da ATP III 2001 e 2004 per la diagnosi di sindrome metabolica.

	ATP III 2001	ATP III 2004
Circonferenza vita	>102 cm (m) e >88 cm (f)	>102 cm (m) e >88 cm (f)
Glicemia	≥110 mg/dL	≥110 mg/dL
Trigliceridi	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL
Colesterolo HDL	<40 mg/dL (m), <50mg/dL (f)	<40mg/dL (m), <50mg/dL (f)
Pressione sistolica/diastolica	≥130/85 mmHg	≥130/85 mmHg

3.1.8 – Calcolo del rischio Framingham

Uno strumento semplice per stimare la probabilità individuale a 10 anni di andare incontro a un primo evento cardiovascolare maggiore (infarto del miocardio o ictus), è rappresentato dal calcolo del rischio Framingham. Il punteggio individuale, oltre ai fattori di rischio considerati nelle carte del rischio cardiovascolare (sesso, età, diabete, abitudine al fumo di sigaretta, pressione arteriosa sistolica, colesterolemia), tiene conto del valore dell'HDL-colesterolemia e della prescrizione di farmaci anti-ipertensivi. Si sottolinea, a questo proposito, che la terapia anti-ipertensiva rappresenta un fattore aggiuntivo per la valutazione di ipertensione di vecchia data. Per valutare tale rischio nella nostra popolazione è stato utilizzato un algoritmo on line disponibile al sito <http://www.newportbodyscan.com/CACrisk.htm>.

Cap. 4 - Risultati

Per quanto riguarda l'aspetto genetico, la popolazione selezionata è stata caratterizzata per il gene *POMC* a livello di tutti e tre i suoi esoni. Parallelamente la stessa indagine è stata condotta sulla popolazione di controllo costituita da soggetti normopeso.

La Tabella 4 mostra le mutazioni e i polimorfismi trovati nel gene *POMC* nei soggetti severamente obesi e negli adulti di controllo.

Tabella 4. Mutazioni e polimorfismi nel gene *POMC*.

	Cambio aminoacidico	Cambio nucleotidico	Obesi, n (%)	Controlli, n (%)
Mutazioni	P231L	8072 C>T	1 (0,5)	0
	R236G	8086 C>G	1 (0,5)	0
	E244X	8110 G>T	1 (0,5)	0
Polimorfismi	93-99	7658-7677 (ins ACG ACG CGC)	20 (10,2)	6 (6)
	93-99	7658-7677 [(ins ACG ACG CGC) ₂]	1 (0,5)	0
	3' UTR	8246 C>T	65 (33,1)	33 (33)
	3' UTR	8246 T>T	9 (4,6)	10 (10)
	93-99 / 3'UTR	7658-7677 (ins ACG ACG CGC) / 8246 C>T	7 (3,6)	2 (2)
	C6C / 3' UTR	4512 C>T / 8246 C>T	1 (0,5)	0

I polimorfismi di POMC erano presenti nel 52.5% degli obesi e nel 51.0% dei controlli. Nell'esone 3 di POMC è stato individuato un'inserzione di 9- e 18-bp tra il codone 93 e 99, rispettivamente: AGC AGC CGC (S-S-G) and AGC AGC CGC AGC AGC CGC (S-S-G-S-S-G); il polimorfismo 8246 C>T nella regione 3'-UTR; e il polimorfismo silente 4512 C>T (C6) nell'esone 2.

Le femmine obese con il polimorfismo 8246 C>T o T>T hanno più bassi livelli di trigliceridi e più alti livelli di colesterolo HDL rispetto alle femmine obese con il polimorfismo 8246 C>C ($p<0.003$).

Non abbiamo trovato nessuna associazione tra sindrome metabolica e i polimorfismi di POMC.

Le mutazioni nel gene POMC sono state trovate in 3 dei 196 soggetti obesi studiati, due nuove e una già nota. Nessuna mutazione è stata invece trovata nei soggetti di controllo. Nel caso 1 è stata individuata la mutazione eterozigote R236G, già nota, che provoca la distruzione di un sito di taglio tra il peptide β -MSH e la β -endorfina, producendo così una proteina di fusione β -MSH/ β -endorfina (11, 12).

Il caso 2 presenta una nuova mutazione eterozigote P231L a livello del peptide β -MSH. Lo studio predittivo della struttura secondaria del peptide portatore della mutazione P231L indica un aumento della struttura distesa (extended strand structure) (55.56% vs 38.89%) e una diminuzione della struttura avvolta (random coil) (44.44% vs 61.11%) rispetto al peptide normale.

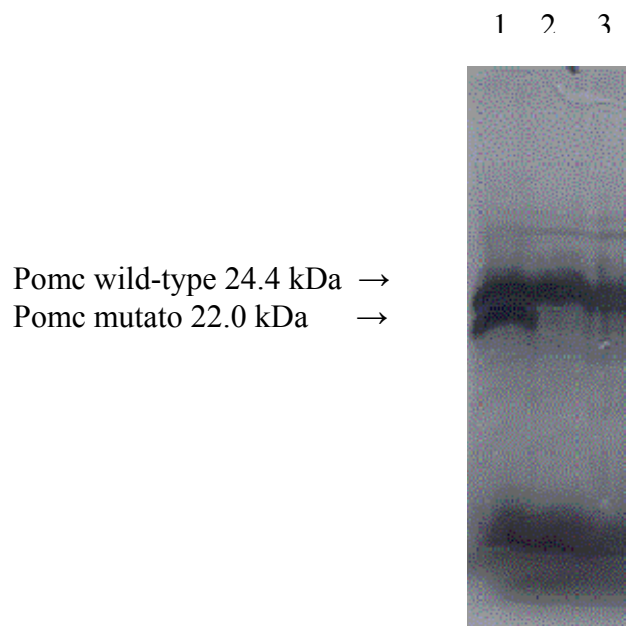
L'allineamento della sequenza proteica indica che, vicino alla sequenza H-F-R-W, la prolina in posizione 231 era altamente conservata tra differenti specie mammifere e non mammifere (uomo, maiale, pecora, cavallo, ratto, topo, elefante africano, rana, pollo e ostrica).

Il caso 3 è portatore di una nuova mutazione eterozigote che introduce un codone di stop a livello del peptide della β -endorfina (E244X), e della già descritta inserzione di 9-bp (AGC AGC CGC, S-S-G) in omozigosi tra il codone 93 e 99.

Dopo retrotrascrizione e traduzione di questo DNA mutato abbiamo verificato, mediante protein truncation test, che questa variante causa la sintesi di un peptide tronco più corto (~22.0 kDa) rispetto a

quello (~24.4 kDa) (Figura 1). Questo è l'unico paziente di colore non italiano.

Figura 1. Analisi mediante Protein Truncation Test dei trascritti dell'esone 3 dal paziente mutato (lane 1 , caso 3) e da 2 controlli non obesi (lanes 2 e 3).



I parametri biochimici e ormonali valutati nei pazienti obesi sono riportati nella Tabella 1. I livelli di tireotropina, delle frazioni libere di triiodiotironina e di tiroxina, ACTH e cortisolo in tutti i pazienti obesi presentavano valori che rientravano nel range di riferimento dei soggetti sani.

Nelle Tabelle 5 e 6 sono riportati i range (2,5° - 97,5° percentile) di leptina, adiponectina e resistina nella popolazione di controllo e nei pazienti obesi suddivisi per sesso. Le differenze dei valori tra i due sessi per ogni variabile sono state valutate statisticamente mediante il test “U di Mann-Whitney”. Il test è stato considerato significativo per valori di $p < 0,05$. Come mostrato in Tabella 5 i valori di leptina differiscono tra maschi e femmine con un valore di $p < 0,0001$, quelli di adiponectina con un valore di $p < 0,001$. Nei pazienti obesi (Tabella 6) è significativa la differenza tra i due sessi per i valori di leptina ($p < 0,0001$) e di resistina ($p = 0,003$).

Tabella 5. Range di riferimento (2,5° -97,5° percentile) di leptina, resistina e adiponectina in soggetti normopeso dell'area campana (n=100).

	Maschi	Femmine	<i>P</i>*
Leptina (ng/ml)	3.4 – 32.3	5.8 – 96.8	<0.0001
Resistina (ng/ml)	0.7 – 46.5	4.4 – 32.8	n.s.
Adiponectina (µg/ml)	6.2 – 128	7.8 – 165.8	0.001

* differenza statisticamente significativa al livello di probabilità indicata.

n.s.= differenza non significativa

Tabella 6. Range di leptina, resistina e adiponectina (2,5°-97,5° percentile) in soggetti severamente obesi dell'area campana (n=165).

	Maschi	Femmine	<i>p</i>*
Leptina (ng/ml)	10.4 – 196.2	37.3 – 238.1	<0.0001
Resistina (ng/ml)	4.7 – 30.6	3 – 28.4	0.003
Adiponectina (µg/ml)	0.36 – 98.7	1.2 – 109.8	n.s.

* differenza statisticamente significativa al livello di probabilità indicata.

n.s.= differenza non significativa

Dal confronto effettuato mediante il test U di Mann-Whitney, delle tre adipocitochine nella popolazione obesa con quella di controllo, sono risultate statisticamente significative le differenze tra i valori sierici di Leptina sia nei maschi che nelle femmine ($p < 0.0001$) e quelli di Adiponectina solo nelle femmine ($p < 0.0001$). La Resistina non cambia in entrambi i sessi mentre per l'Adiponectina pur osservando valori più bassi nei maschi, la variazione non è significativa. Abbiamo inoltre valutato la correlazione tra i livelli delle tre adipocitochine e il BMI mediante una correlazione bivariata valutando il coefficiente Rho di Spearman. I risultati mostrano un'associazione positiva statisticamente significativa solo tra Leptina e BMI in entrambi i sessi (maschi: $p < 0.0001$ e femmine: $p = 0.002$).

La prevalenza della sindrome metabolica era del 61.4% nei maschi e 43.2% nelle femmine (ATP III 2001) e del 65.7% nei maschi e 46.3% nelle femmine (ATP III 2004).

In questi pazienti la valutazione dello stato infiammatorio è stata effettuata dosando i livelli sierici di Proteina C Reattiva (PCR) e Ferritina. I pazienti sono stati suddivisi per sesso e per

presenza/assenza di Sindrome Metabolica (SM). I risultati (2,5° - 97,5° percentile) sono riportati in Tabella 7. L'unica differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra i livelli di Ferritina nelle femmine con e senza SM ($p=0.004$).

Tabella 7. Livelli sierici di PCR e Ferritina nei soggetti severamente obesi dell'area campana (n=165) suddivisi per sesso e presenza/assenza della Sindrome Metabolica (SM).

	MASCHI		
	SM sì	SM no	<i>p</i>*
PCR (mg/dl)	0.3 - 23.2	0.3 - 48.4	n.s.
Ferritina (ng/ml)	10 - 365	9 - 454	n.s.
	FEMMINE		
	SM sì	SM no	<i>p</i>*
PCR (mg/dl)	0.65 - 33.05	0.7 - 30.9	n.s.
Ferritina (ng/ml)	10 - 683	6 - 302	0.004

* differenza statisticamente significativa al livello di probabilità indicata.

n.s.= differenza non significativa

Inoltre è stato valutato lo stato di ossidazione lipidica dosando in questi stessi pazienti i livelli sierici delle LDL ossidate (oxLDL) e

degli Anticorpi anti-LDL ossidate (Ab-oxLDL). Anche in questo caso i pazienti sono stati suddivisi per sesso e per presenza/assenza di Sindrome Metabolica (SM). I risultati (2,5° - 97,5° percentile) sono riportati in Tabella 8. I valori di oxLDL e Ab-oxLDL non differiscono tra maschi e femmine, tuttavia una differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra i livelli di Ab-oxLDL nelle femmine con e senza SM ($p = 0.004$).

Tabella 8. Livelli sierici di Ox-LDL e Ab-oxLDL in soggetti severamente obesi (n=165) dell'area campana suddivisi per sesso e per presenza/assenza di Sindrome Metabolica (SM).

	MASCHI		
	SM sì	SM no	<i>P</i>*
Ox LDL (U/L)	11.07 – 83.14	20.32 – 86.91	n.s.
Ab-oxLDL (U/mL)	10.95 – 111.35	12.22 – 300.17	n.s.
	FEMMINE		
	SM sì	SM no	<i>p</i>*
Ox LDL (U/L)	22.86 – 99.03	19.6 – 85.9	n.s.
Ab-oxLDL (U/mL)	13.31 – 97.82	11.12 – 80.5	0.004

* differenza statisticamente significativa al livello di probabilità indicata.

n.s.= differenza non significativa

Abbiamo quindi valutato eventuali differenze tra i livelli sierici di leptina, adiponectina e resistina nei due gruppi di pazienti con e senza SM divisi sempre per sesso. I risultati, riportati in Tabella 9, non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa.

Tuttavia un trend a valori più bassi di adiponectina, in presenza della SM è stato osservato nelle femmine.

Tabella 9. Livelli sierici di Leptina, Resistina e Adiponectina in maschi e femmine con e senza SM.

	MASCHI	
	SM sì	SM no
Leptina (ng/ml)	12.53 – 191.25	3.28 – 213.28
Resistina (ng/ml)	4.77 – 26.0	4.7 – 46.37
Adiponectina (µg/ml)	0.08 – 98.44	0.44 – 99.82
	FEMMINE	
	SM sì	SM no
Leptina (ng/ml)	32.62 – 240.54	46.06 – 234.42
Resistina (ng/ml)	2.15 – 32.82	5.07 – 26.21
Adiponectina (µg/ml)	1.16 – 108.61	1.85 – 147.09

Lo stesso confronto è stato effettuato per tutte le variabili biochimico-antropometriche valutate nella nostra popolazione e le uniche differenze statisticamente significative si evidenziavano nei due sessi tra affetti e non da sindrome metabolica a livello delle variabili riportate in Tabella 10.

Tabella 10. Variabili biochimiche e metaboliche nei soggetti severamente obesi dell'area campana (n=165) suddivisi per sesso e per presenza/assenza della Sindrome Metabolica (SM).

	Maschi		<i>p</i> *
	SM sì	SM no	
Età, anni	16 – 64	15 – 61	n.s.
BMI, kg/m ²	38,6 – 63,2	38,3 – 94,1	n.s.
Colesterolo totale, mmol/L	88 – 264	130 – 224	<0,0001
Colesterolo HDL, mmol/L	25 – 46	29 – 76	n.s.
Colesterolo LDL, mmol/L	41,8 – 184,6	64,6 – 157,6	n.s.
Trigliceridi, mmol/L	54 – 279	31 – 309	<0,001
Glucosio, mmol/L	57 – 112	81 – 115	n.s.
Insulina, mIU/L	9,5 – 46	8,8 – 47,2	n.s.
HOMA	1,5 – 11,5	1,9 – 11,4	n.s.
Pressione sistolica, mmHg	105 – 160	110 – 180	n.s.
Pressione diastolica, mmHg	55 – 106	70 – 110	n.s.

	Femmine		<i>p</i> *
	SM sì	SM no	
Età, anni	13,5 – 56	16 – 83	n.s.
BMI, kg/m ²	40,1 – 76,6	38 – 60,1	<0,001
Colesterolo totale, mmol/L	115 – 276	129 – 263	<0,002
Colesterolo HDL, mmol/L	29,5 – 53,5	37 – 80	<0,0001
Colesterolo LDL, mmol/L	54,7 – 206,4	77,6 – 176,8	<0,01
Trigliceridi, mmol/L	54,7 – 280,8	48 – 233	<0,005
Glucosio, mmol/L	64,5 – 119	67 – 121	n.s.
Insulina, mIU/L	7,2 – 53,3	4,3 – 48	n.s.
HOMA	1,4 – 12,6	0,8 – 11,8	n.s.
Pressione sistolica, mmHg	95 – 160	100 – 140	n.s.
Pressione diastolica, mmHg	60 – 100	60 – 95	n.s.

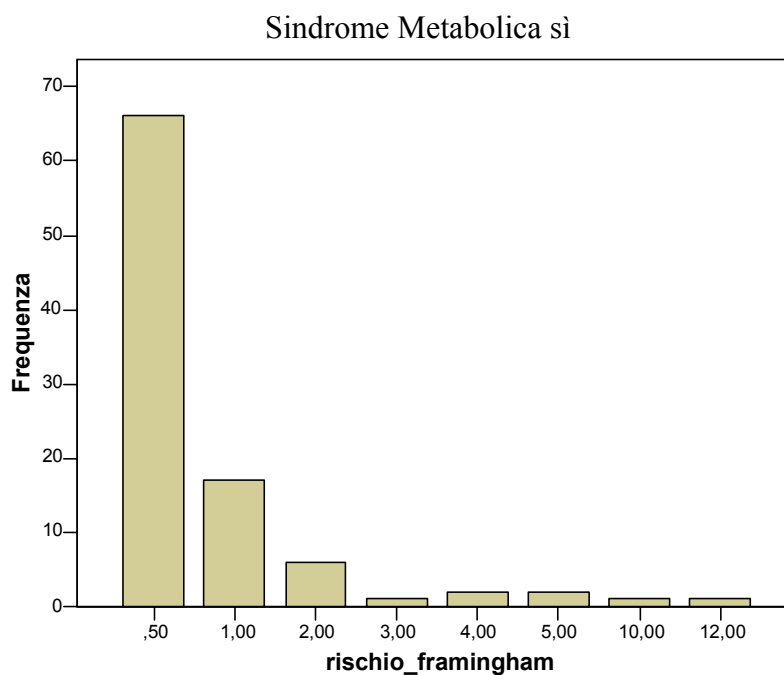
*differenza statisticamente significativa a livello di probabilità indicata
n.s. = differenza non significativa

Abbiamo quindi condotto un'analisi Cluster TwoStep mediante il software SPSS v 12.0 per valutare eventuali raggruppamenti (cluster) a livello dei parametri testati nella popolazione di obesi. Le nostre variabili, sia biochimiche che antropometriche, si raggruppavano in due cluster verosimilmente per la sola influenza del sesso. Infatti, le differenze tra le medie delle variabili analizzate, valutate tramite un test *t* di Student, non risultavano statisticamente significative tra i due cluster. Abbiamo quindi eliminato il sesso tra le variabili di raggruppamento; i cluster si formavano in tal caso per l'influenza delle variabili categoriche "abitudine al fumo" e "anamnesi familiare". Anche in questo caso le differenze tra le medie delle variabili analizzate non risultavano statisticamente significative tra i due cluster.

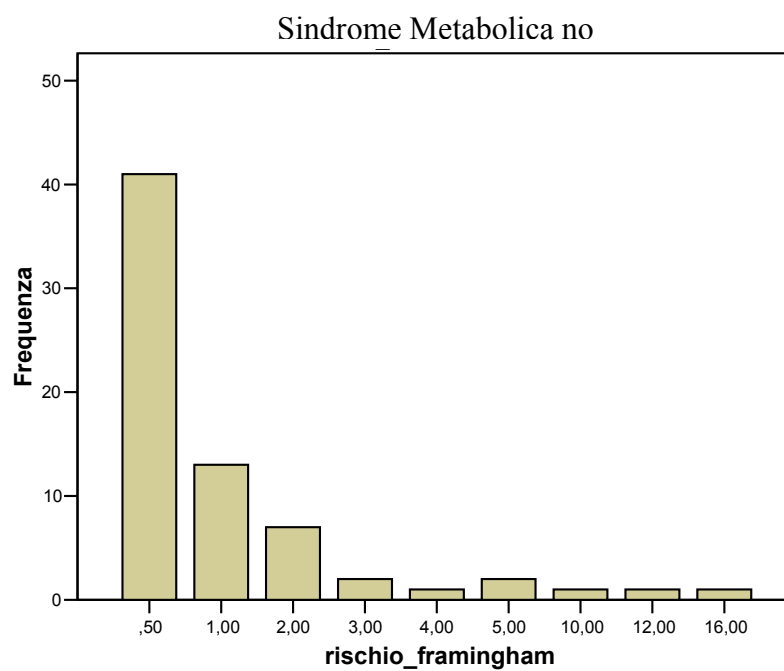
Abbiamo altresì valutato il rischio Framingham in tutta la popolazione riscontrando, come mostrato nella Figura 2, una prevalenza di un rischio inferiore o uguale all'1% nell'86.5% dei pazienti con SM (pannello A) e nel 78.3% dei pazienti senza SM (pannello B).

Figura 2. Prevalenza del rischio Framingham in soggetti severamente obesi dell'area campana suddivisi per presenza/assenza di Sindrome Metabolica (SM).

A



B



Cap. 5 - Discussione

Studi familiari hanno evidenziato come nell'insorgenza dell'obesità la componente genetica giochi un ruolo rilevante oscillante tra il 10-70%. Tra i geni coinvolti quello della proopiomelanocortina, appartenente al circuito della melanocortina, appare molto promettente.

L'analisi del gene POMC effettuata nella nostra popolazione severamente obesa ha evidenziato tre mutazioni in tre pazienti diversi (una già descritta e due nuove).

La mutazione R236G, nell'esone 3, già descritta, altera il sito di taglio K235-R236 riconosciuto dalla proconvertasi 2 (PC2), alterando il processing di POMC producendo così una proteina di fusione β -MSH/ β -endorfina, che è meno abile rispetto alla forma wild-type ad attivare il recettore MC4R (12).

La mutazione R236G è stato riportato co-segregare con l'insorgenza dell'obesità nello 0.76% dei soggetti obesi inglesi (2/262, BMI standard deviation score [sds] >2.5) ed era assente in 412 soggetti di controllo. Inoltre, in uno dei due pazienti mutati, la variante co-segregava in famiglia con l'obesità da oltre tre

generazioni (12). In uno studio francese, la mutazione R236G era presente nel 1.65% dei casi (3/182, BMI medio > 31.8 kg/m²) in associazione con l'obesità precoce e nel 1.04% dei controlli (12). La mutazione è stata individuata anche nel 1.15% di bambini obesi italiani (1/87, BMI sds = 3.43) (63) e in 1/156 pazienti danesi con obesità giovanile (BMI = 35.8 kg/m²) diagnosticata all'età di 20 anni, età che coincide con quella del nostro portatore, una donna diagnosticata obesa all'età di 21 anni.

La seconda mutazione, mai descritta, nell'esone 3 di POMC produce il cambio aminoacidico P231L a livello del peptide β -MSH. Data la struttura secondaria di questo peptide di 18 aminoacidi, il cambio prolina-leucina potrebbe modificare la struttura secondaria della sequenza del core H-F-R-W (64). Il peptide β -MSH si lega al MC4R mediante questa sequenza, con una più alta affinità rispetto all' α -MSH, risultando il ligando principale per l'MC4R nel regolare l'assunzione di cibo (65). Sia la sequenza del core che il residuo di prolina in posizione 231 sono altamente conservati tra le specie, quindi noi suggeriamo che la sostituzione con la leucina alteri l'affinità di legame all'MC4R contribuendo

così all'obesità nel nostro paziente. Per verificare questa ipotesi dovrà essere effettuato uno studio funzionale.

La terza mutazione, mai descritta, nell'esone 3 di POMC produce un peptide tronco a livello della β -endorfina al codone 244. La mutazione pur essendo presente a livello eterozigote nel nostro paziente potrebbe comunque essere causativa di obesità. Infatti, anche se è noto che la maggior parte dei trascritti non-senso sono riconosciuti ed efficientemente degradati mediante il meccanismo nonsense-mediated mRNA (66), questo pathway talora può causare malattia mediante l'induzione dell'aploinsufficienza e/o di un effetto negativo dominante della proteina mutata (66). Nel nostro paziente quindi l'obesità potrebbe essere insorta in seguito al predetto meccanismo. Interessante notare in tal senso che topi knock-out per la β -endorfina sviluppano un aumento della massa grassa nel corso della vita (67), un simile effetto coinciderebbe con l'insorgenza tardiva dell'obesità nel nostro paziente portatore della mutazione eterozigote E244X.

Altro obiettivo dello studio condotto nella nostra popolazione di soggetti con un'obesità di grado severo (BMI>40), era la

caratterizzazione biochimica anche a livello delle principali adipocitochine (Leptina, Resistina e Adiponectina).

Lo step preliminare è consistito nel definire i livelli di riferimento in una popolazione di soggetti controllo normopeso (BMI<25). I risultati di questa valutazione hanno messo in evidenza differenze statisticamente significative tra i due sessi a livello della Leptina ($p < 0.0001$) e della Adiponectina ($p = 0.001$).

Sono stati quindi dosati i livelli delle tre adipocitochine nella popolazione obesa, differenze significative tra maschi e femmine sono emerse per la Leptina ($p < 0.0001$) e per la Resistina ($p = 0.003$).

Il confronto delle tre variabili tra gli obesi e i controlli ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nei livelli di Leptina (in entrambi i sessi) e nei livelli di Adiponectina (solo nelle femmine).

Per quanto riguarda la Leptina i nostri risultati nei controlli e negli obesi sono in linea con quelli già descritti in letteratura, in cui sono riportate concentrazioni sieriche di Leptina significativamente più alte nelle donne normopeso rispetto agli uomini normopeso e più

alte nelle donne obese rispetto agli uomini obesi (68,69,70). In particolare i livelli mediani di Leptina misurati negli obesi sono circa 2 volte superiori a quelli dei soggetti normopeso e sono correlati con il BMI. Tali dati sono concordi con quelli presenti in letteratura, infatti in uno studio su una popolazione di Singapore le concentrazioni medie di Leptina misurate nelle donne erano più del doppio di quelli degli uomini con BMI simile e correlavano con la percentuale di grasso corporeo ($r=0.85$, $p < 0.001$) (70).

Per quanto riguarda l'Adiponectina, i nostri dati evidenziano valori più bassi nei soggetti obesi rispetto ai controlli, senza differenze tra i sessi statisticamente significative per i soggetti obesi. Altri studi (71) hanno dimostrato che i livelli sierici in soggetti non obesi ($BMI < 30 \text{ Kg/m}^2$) sono diversi nei due sessi (mediana M: $10.9 \mu\text{g/ml}$; mediana F: $14.5 \mu\text{g/ml}$) avendo le femmine concentrazioni più elevate rispetto ai maschi come nella nostra casistica di controllo (mediana M: $20.8 \mu\text{g/ml}$; mediana F: $38.6 \mu\text{g/ml}$). Gli autori di questo lavoro (71) osservano che le concentrazioni sieriche di Adiponectina nei maschi diminuiscono all'aumentare dell'età, probabilmente come una conseguenza dell'aumento del grasso

corporeo che si ha con l'avanzare dell'età. Anche nella nostra popolazione si osserva un trend positivo tra Adiponectina e BMI pur non essendo esso statisticamente significativo.

È stata dosata anche la Resistina suddividendo i soggetti (maschi e femmine) in base al BMI. I nostri dati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra soggetti obesi e controllo. I soggetti obesi maschi presentavano valori leggermente più elevati delle donne obese ($p = 0.003$). Dati della letteratura indicano invece in soggetti controllo e obesi valori di Resistina nei maschi con BMI < 30 e > 30 differenti in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$), avendo i maschi valori di Resistina più elevati (71). I nostri dati sulla Resistina negli obesi non evidenziano alcuna associazione con il BMI. Ciò si potrebbe spiegare, come suggerito da altri autori, in base a variazioni della Resistina osservate in dipendenza dell'età e correlate più con la massa grassa che con il BMI. Infatti, con l'aumentare degli anni pur rimanendo invariato il BMI varia la percentuale di massa grassa su massa magra (71). Purtroppo nella nostra popolazione mancavano tali misurazioni. Altra spiegazione è che la Resistina possa variare in dipendenza dell'insulino-resistenza

e i nostri pazienti non presentavano in misura rilevante tale difetto (72).

Altro aspetto investigato nel nostro studio è stata la presenza dei fattori di rischio di CVD che nel loro insieme definiscono la “Sindrome Metabolica”. Non esistono infatti in letteratura dati in popolazioni di soggetti severamente obesi.

La sindrome metabolica è presente in più della metà dei nostri pazienti (>50%), valori più elevati di quelli osservati in popolazioni generali (30-40%) (73).

A questo punto, abbiamo valutato lo stato infiammatorio e quello ossidativo dei pazienti obesi affetti e non da sindrome metabolica distinti per sesso. Abbiamo perciò dosato alcuni markers tipici di infiammazione, quali PCR e Ferritina, e l'unica differenza significativa statisticamente è stata osservata nelle femmine con sindrome metabolica a livello della Ferritina ($p < 0.004$). Valori di Ferritina, riportati in letteratura, sono stati valutati in una popolazione americana affetta da sindrome metabolica distinta per sesso e le cui donne erano suddivise in base alla pre- e post-

menopausa. Valori di Ferritina più elevati sono stati osservati nelle donne in post-menopausa (74).

Una possibile spiegazione della relazione esistente tra i depositi di ferro e sindrome metabolica è l'infiammazione. L'obesità nella Sindrome Metabolica è associata ad una risposta infiammatoria cronica caratterizzata da una produzione anormale di citochine e da un aumento dei markers della fase acuta. L'attivazione delle citochine infiammatorie aumenta la trascrizione dell' mRNA della Ferritina nei macrofagi, aumentando così il trasferimento della Ferritina agli epatociti (75,76).

Abbiamo dosato quindi negli stessi pazienti, le LDL ossidate e gli anticorpi anti-LDL ossidate, e anche in questo caso l'unica differenza era osservata sempre nelle femmine con sindrome metabolica a livello degli anticorpi ($p = 0.004$) anche se i valori rientravano nell'intervallo di riferimento di soggetti normopeso.

Le tre adipocitochine, di cui sopra, sono state valutate anche nei pazienti con e senza sindrome metabolica in ambo i sessi e il loro confronto non ha messo in evidenza alcuna differenza significativa.

Lo stesso confronto è stato effettuato per tutte le variabili biochimico-antropometriche valutate nella popolazione obesa, come mostrato in Tabella 10.

È importante sottolineare che a parte le variabili per le quali erano attesi valori diversi in dipendenza della presenza/assenza della sindrome Metabolica, anche i livelli di colesterolo totale erano diversi, essi risultavano però maggiori nei pazienti non affetti da tale sindrome (mediana M SM sì=172; mediana M SM no=177; mediana F SM sì=176; mediana F SM no=199). Occorre in tal senso sottolineare che il colesterolo totale, pur non rientrando tra i cinque criteri diagnostici proposti dall'ATPIII per la definizione di Sindrome Metabolica, è comunque un importante fattore di rischio cardiovascolare che perciò potrebbe essere sottovalutato categorizzando la popolazione solo in base alla presenza/assenza di Sindrome Metabolica, ciò porterebbe ad escludere alcuni pazienti da un eventuale iter terapeutico preventivo.

Abbiamo infine calcolato il rischio Framingham in tutta la popolazione, e come si è potuto osservare dalla Figura 2, si tratta di un rischio molto basso anche nei pazienti obesi con Sindrome

Metabolica. Una possibile spiegazione, osservando tutti questi dati, è che forse la popolazione è stata selezionata in maniera molto accurata con delle caratteristiche molto stringenti che individuano una popolazione “obesa pura”, nel senso che si tratta di grandi obesi ma con nessuna grave complicanza in atto. In tali condizioni sembra che i fattori di maggior peso che condizionano l’andamento di tutte le variabili esaminate siano principalmente il sesso e l’età, con l’abitudine al fumo e l’anamnesi familiare a giocare un ruolo di secondo livello, come risulta dai risultati ottenuti dall’analisi Cluster TwoStep.

In conclusione il progetto di studio affrontato rappresenta un contributo rilevante ai fattori genetici coinvolti nell’insorgenza dell’obesità severa nell’area campana ed una caratterizzazione biochimica puntuale a livello dei fattori biochimici maggiormente associati al rischio di complicanze cardiovascolari, complicanze che più frequentemente si sviluppano nei grandi obesi.

Cap. 6 - Bibliografia

1. Korner J, Aronne LJ. The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 2003;111:565–70.
2. Marra M, Scalfi L, Contaldo F, Pasanisi F. Fasting respiratory quotient as a predictor of long-term weight changes in non-obese women. *Ann Nutr Metab* 2004;48:189–92.
3. Taubes G. as obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 1998;280:1367-1368.
4. WHO, Physical status: the use and interpretation of anthropometry, WHO technical report series 854, World Health Organization Geneva 1995.
5. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake [Review]. *Nature* 2000;404:661–71.
6. Bruch H., *Patologia del comportamento alimentare*, Feltrinelli Editore, Milano, 2000.
7. Egger G., Swinburn B., An “Ecologica” approach to the obesity pandemic, *British Medical Journal* 1997;315:477-480.
8. Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O’Rahilly S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics [Review]. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2557–62.

9. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by *POMC* mutations in humans. *Nat Genet* 1998;19:155–7.
10. Raffin-Sanson ML, de Keyzer Y, Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions (Review). *Eur J Endocrinol* 2003;149:79-90.
11. Echwald SM, Sørensen TIA, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O. Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:293–8.
12. Challis BG, Pritchard LE, Creemers JWM, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, et al. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 2002;11:1997–2004.
13. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A et al. “Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo”. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82: 4196-4200.
14. Kahn BB, Flier JS. “Obesity and insulin resistance”. *J Clin Invest* 2000;106: 473-481.

15. Reaven GM, Mondon CE. "Effect of in vivo plasma insulin levels on the relationship between perfusate free fatty acid concentration and triglyceride secretion by perfused rat livers". *Horm Metab Res* 1984;16: 230-232.
16. Kissebah AH. "Insulin resistance in visceral obesity". *Int J Obesity* 1991;15: 109-115.
17. Bouchard C. "Genetics of obesity". CRC Press, 1994.
18. Astrup A et al. "Fat metabolism in the predisposition to obesity". *Ann NY Acad Sci* 1997;827: 427-433.
19. Wilmore JH, Despres JP, Stanforth PR et al. "Alteration in body weight and composition consequent to 20 week of endurance training: the heritage family study". *Am J Clin Nutr* 1999;70: 346-352.
20. Kershaw EE, Flier JS. "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endo and Metab* 2004;89 (6): 2548-2556.
21. Miner JL. "The adipocyte as an endocrine cell." *J Anim Sci* 2004;82: 935-941.
22. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 1994;372: 425-432.
23. Pelleymounter M, Cullen M, Baker M et al. "Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice." *Science* 1995 ;269: 540-543.

24. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS et al. "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutation in the ob (leptin) receptor." *Science* 1996;271: 994-996.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E et al. "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." *Nature Med* 1995;1(11): 1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al. "Serum immunoreactive-leptin concentration in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med* 1996;334: 292-295.
27. Vettor R et al. "Introduction and reversibility of an obesity syndrome by intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats." *Diabetologia* 1994;37: 1202-1208.
28. De Courten MP, Zimmet PM, Hodge A. "Hyperleptinaemia: the missing link in the Metabolic Syndrome?" *Diabetic Med* 1997;14: 200-208.
29. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA.. "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409: 307-312.
30. Rea R, Donnelly R. "Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity?" *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2004;6: 163-170.
31. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliwer WR Jr, Willson TM, Klierer SA,

- Hotamisligil GS. "Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by PPARgamma agonists." *J Biol Chem* 2001;276: 25651-3.
32. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. "A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation." *J Biol Chem* 2001;276: 11252-6.
33. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS et al. "Regulation of fasted blood glucose by resistin." *Science* 2004 ;303: 1195-1198.
34. Banerjee RR, Lazar MA. "Resistin: molecule history and prognosis." *J Mol Med* 2003;81: 218-226.
35. Tartaglia LA, Goeddel DV. "Two TNF receptors." *Immunol Today* 1992;13: 151-153.
36. Guerre-Millo M. "Adipose tissue and adipokines: for better or worse." *Diabetes Metab* 2004;30: 13-9.
37. Sethi JK, Hotamisligil GS. "The role of TNF- α in adipocyte metabolism." *Semin Cell Dev Biol* 1999;10: 19-29.
38. Hotamisligil GS. "The role of TNF- α and TNF receptors in obesity and insulin-resistance." *J Intern Med* 1999;245: 621-625.
39. Kawaakami M, Murase T, Ogawa H et al. "Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells." *J Biochem* 1987; (Tokio) 101: 331-338.

40. Tsigos C, Kyrou I, Chala E et al. "Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity." *Metabolism* 1999;48: 1332-1335.
41. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. " Adipose expression of tumor necrosis factor alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* 1993;259: 87-91.
42. Nisoli E, Briscini L, Giordano A, Tonello C, Weisbrock SM, Uysal KT, Cinti S, Carruba MO, Hotamisligil GS. "Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocytes function in obesity." *Proc Natl Acad Science USA* 2000;97: 8033-8038.
43. Paquot D, Castillo MJ, Lefebvre PJ, Scheen AJ. "No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients." *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1316-1319.
44. Patiang D, Gray S, Idris I, Donnelly R. "Effects of tumor necrosis factor and protein Kinase C inhibition on glucose uptake in L6 myoblasts." *Clin Sci* 2000 ;99: 303-307.
45. Yamasaki H, Yamaguchi Y, Takino U et al. "TNF- α stimulates glucose uptake in L6 myoblasts." *Diabetes Res Clin Pract* 1996 ;32: 11-18.
46. Froed SL, Bunkin DA, Greenberg AS. "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release

- interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid". *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 847-850.
47. Yudkin JS, Jumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. "Inflammation, obesity, stress, coronary heart disease: is interleukin-6 the link?" *Atherosclerosis* 2000;148: 209-214.
48. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. "Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans." *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77: 1690-1694.
49. Brunel EJ, Marmot MG, Nanchahal K et al. "Social inequality in coronary risk: central obesity and the metabolic syndrome." Evidence from the White hall II Study. *Diabetologia* 1997; 40: 1341-1349.
50. Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP. "Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation." *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82: 4167-4170.
51. Van Snick J. "Interleukin-6: an overview." *Annu Rev Immunol* 1990 ;8: 253-278.
52. Hardardottir I, Grundfeld C, Feingold KR. "Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism." *Curr Opin Lipidol* 1994;5: 207-215.
53. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. "Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between

- visceral fat accunulation and vascular disease.” *Diabetes* ;46: 860-867.
54. Vague P, Juhan-Vague I, Aillaud MF et al. “Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level and relative body weight in normal and obese subjects.” *Metabolism* 1986;35: 250-253.
55. Umemura S, Nyui N, Tamura K et al. “Plasma angiotensinogen concentration in obese patients.” *Am J Hypertens* 1997;10: 629-633.
56. Zorad S, Fickova M, Zelezna B, Macho L, Kral JG. “The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity.” *Gen Physiol Biophys* 1995;14: 383-391.
57. Dusserre E, Moulin P, Vidal H. “Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues.” *Biochim Biophys Acta* 2000;1500: 88-96.
58. Contaldo F, Pasanisi F. Obesity epidemics: secular trend or globalization consequence? Beyond the interaction between genetic and environmental factors. *Clin Nutr* 2004;23:289–9117.
59. Marra M, Pasanisi F, Scalfi L, Colicchio P, Chelucci M, Contaldo F. The prediction of basal metabolic rate in young adult, severely obese patients using single-frequency

- bioimpedance analysis. *Acta Diabetol* 2003;40(Suppl):S139–41.
60. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109:121–4.
61. Siedel J, Schlumberger H, Klose S, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Improved reagent for enzymatic determination of serum cholesterol. *J Clin Chem Biochem* 1981;19:838–9.
62. Wahlefeld AW. Triglyceride determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed., Vol. 4. Weinheim: Verlag Chemie and New York Academic Press, 1974;1831.
63. Miraglia del Giudice E, Cirillo G, Santoro N, D’Urso L, Carbone MT, Di Toro R, et al. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:61–7.
64. Yang YK, Harmon CM. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake [Review]. *Obesity* 2003;4:239–48.
65. Harrold JA, Widdowson PS, Williams G. α -MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? *Peptides* 2003;24:397–405.
66. Chatranyamonti A, Angelini M, Garelli E, Tchernia G, Ramenghi U, Dianzani I, et al. Nonsense-mediated and

- nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2004;24:526–33.
67. Robinson SW, Dinulescu DM, Cone RD. Genetic models of obesity and energy balance in the mouse [Review]. *Annu Rev Genet* 2000;34:687–745.
68. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A et al. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-295.
69. Chessler SD, Fujimoto WY, Shofer JB, Boyko EJ, Weigle DS. Increased plasma leptin levels are associated with fat accumulation in Japanese Americans. *Diabetes* 1998;47(2):239-243.
70. Chow VTK and Phoon. Measurement of serum leptin concentrations in university undergraduates by competitive elisa reveals correlations with body mass index and sex. *Advances in Physiology Education* 2003;27(2):70-77.
71. Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, Broch M et al. Distribution and determinants of adiponectin, resistin and ghrelin in a randomly selected healthy population. *Clinical Endocrinology* 2005;63:329-335.
72. Matsuzawa Y. Adipocytokines and Metabolic Syndrome. *Seminars in Vascular Medicine* 2005;5(1):34-39.

73. Moller DE and Kaufman KD. Metabolic Syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu. Rev. Med.* 2005;56:45-62.
74. Jehn M, Clark JM, Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care* 2004;27(10):2422-2428.
75. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1785-1788.
76. Sibille JC, Kondo H, Aisen P. Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology* 1988;8:296-301.