

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE ENDOCRINE E METABOLICHE

Direttore: Chiar.mo Prof. Paolo Vitti



Aspetti clinici e molecolari nella lipodistrofia congenita generalizzata: descrizione di una mutazione in una paziente con Sindrome di Berardinelli-Seip

Relatore:

Prof. Ferruccio Santini

Candidata

Dott.ssa Caterina Pelosini

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

RIASSUNTO	pag. 3
1. INTRODUZIONE	pag. 5
<i>1.1 Le lipodistrofie</i>	<i>pag. 5</i>
<i>1.2 Lipodistrofia congenita generalizzata</i>	<i>pag. 12</i>
<i>1.3 Caratteristiche genetiche della CGL</i>	<i>pag. 16</i>
3. CASO CLINICO	pag. 22
4. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	pag. 29
5. BIBLIOGRAFIA	pag. 32

RIASSUNTO

Il termine “lipodistrofia” identifica un gruppo eterogeneo di sindromi contraddistinte da anomalie del tessuto adiposo, perdita generalizzata o parziale del grasso corporeo, alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico, importante resistenza all'insulina endogena ed esogena e disordini immunologici.

La lipodistrofia congenita generalizzata o Sindrome di Berardinelli-Seip, è una malattia rara a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata dall'assenza quasi totale di tessuto adiposo fin dalla nascita. La prevalenza stimata è di 1 caso su 10 milioni di nati vivi e attualmente il numero di pazienti descritti in letteratura è di circa 200.

I geni responsabili del 95% dei casi di lipodistrofia congenita generalizzata sono l'1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasi beta (AGPAT2) e il gene denominato Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (BSCL2), entrambi coinvolti nel processo di differenziamento adipocitario. AGPAT2 è localizzato sul cromosoma 9q34 e codifica per l'enzima 1-acil-sn-glicerol-3 fosfato aciltransferasi, responsabile della conversione dell'acido lisofosfatidico in fosfatidato.

BSCL2, localizzato sul cromosoma 11q13, codifica per la seipina, una proteina che se mutata risulta responsabile delle forme più gravi della

malattia.

In questa tesi viene presentato il caso di una paziente italiana di 54 anni giunta al Dipartimento di Endocrinologia nel Luglio 2009 per diabete mellito di tipo 2 scarsamente controllato con terapia insulinica. Nata da genitori consanguinei (cugini di primo grado), la donna presentava sin dall'infanzia fenotipo acromegaloide, lipoatrofia diffusa e pseudoipertrofia muscolare. Venivano inoltre riscontrate ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, ipoleptinemia (0,76 ng/ml) e ipoadiponectinemia (1,10 ng/ml). Tali caratteristiche orientavano verso la sindrome di Berardinelli-Seip (BSCL). Al fine di confermare questa impressione diagnostica venivano analizzate le sequenze dei due geni candidati. Il DNA della paziente veniva estratto dai leucociti di sangue periferico ed amplificato mediante PCR. Dallo screening genetico non risultavano mutazioni nella sequenza del gene BSCL2, mentre veniva riscontrata una variante in forma omozigote nell'esone 3 del gene AGPAT2, che determina la sostituzione dell'aminoacido prolina in posizione 112 con l'aminoacido leucina (P112L). I risultati ottenuti dallo screening genetico hanno permesso di confermare la diagnosi di sindrome di Berardinelli-Seip e di identificare per la prima volta la mutazione P112L in un soggetto di razza caucasica.

INTRODUZIONE

1.1 LE LIPODISTROFIE

Il termine “lipodistrofia” identifica un gruppo eterogeneo di sindromi contraddistinte da anomalie del tessuto adiposo, perdita generalizzata o parziale del grasso corporeo, alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico, resistenza all'insulina e disordini immunologici. Ad eccezione della lipodistrofia associata a terapia antiretrovirale nei pazienti affetti da HIV, queste sindromi sono estremamente rare e verosimilmente sotto-diagnosticate, in particolar modo per quanto riguarda le forme parziali.

Nelle sindromi lipodistrofiche è importante sottolineare come la perdita di massa grassa possa essere associata ad anomalie metaboliche talora anche più gravi di quelle che si riscontrano in presenza di un eccesso di grasso (obesità). L'ipertrigliceridemia, l'insulino-resistenza e l'iperglicemia sono alterazioni patologiche riscontrabili quasi costantemente in pazienti affetti da lipodistrofia. Una definita massa grassa sembra infatti essere fondamentale per il mantenimento del normale metabolismo servendo da tessuto reattivo all'insulina per lo smaltimento del glucosio e per l'immagazzinamento dei trigliceridi. Studi condotti su modelli animali che presentano

deficit nel normale sviluppo del tessuto adiposo, sono risultati fondamentali nella comprensione dell'importanza che tale organo riveste nella regolazione del metabolismo sia glucidico che lipidico (1, 2). La mancanza di tessuto adiposo associato all'assunzione di energia in eccesso, conduce al deposito ectopico di grasso in organi quali il fegato e il muscolo e in seguito porta progressivamente alla comparsa di anomalie metaboliche. Il grado di perdita di tessuto adiposo è correlato con la gravità delle anomalie metaboliche. La dislipidemia dei pazienti con lipodistrofia è caratterizzata da livelli elevati di trigliceridi dovuti sia alla ridotta capacità di immagazzinamento che all'aumento della loro sintesi a livello epatico. In correlazione all'ipertrigliceridemia, la maggior parte dei pazienti con lipodistrofia presenta bassi livelli di colesterolo ad alta densità.

Sia la diminuita ossidazione degli acidi grassi che l'aumentata lipogenesi causano un aumento della concentrazione di acidi grassi liberi. Frequentemente si sviluppa diabete mellito nel momento in cui le cellule beta pancreatiche non riescono a compensare l'insulino-resistenza. Nel lungo termine i livelli elevati di trigliceridi insieme all'iperinsulinemia e ai bassi livelli di colesterolo ad alta densità di lipoproteine aumentano il rischio di malattie cardiovascolari (3). L'accumulo epatico di trigliceridi può provocare l'insorgenza di

epatopatia steatosica non alcolica in più di un terzo dei pazienti con lipodistrofia. Pazienti con una concentrazione di trigliceridi superiore a 1000 mg/dl sono a rischio di sviluppare pancreatite acuta, insufficienza pancreatica e possono presentare la comparsa di xantomi dolorosi. Nei pazienti con lipodistrofia è spesso presente iperfagia. Donne affette da lipodistrofia presentano spesso iperandrogenismo e ovaio policistico secondari all'insulino resistenza e alla conseguente iperinsulinemia (4). Alcuni pazienti affetti da lipodistrofia possono sviluppare insufficienza renale (5). Tra i fattori eziologici vengono incluse le glomerulonefriti membranose, la glomerulosclerosi focale segmentaria e la lipidosi tubulare (6, 7). Conseguentemente alla perdita di tessuto adiposo, la secrezione degli ormoni adipocitari, come la leptina, l'adiponectina, la resistina, l'interleuchina-1, l'interleuchina-6 e il TNF-alfa è alterata (8-10). In particolare, bassi livelli circolanti di adiponectina sono predittivi di diabete (11) e malattie cardiovascolari (12).

Classificazione

Prima dei progressi compiuti dalla biologia molecolare, le sindromi lipodistrofiche erano classificate in base all'ereditarietà e all'entità della perdita di tessuto adiposo. Con questo semplice approccio si identificavano forme *congenite (ereditarie)* o *acquisite* che venivano a loro volta sotto classificate in *generalizzate* o *parziali*. Sebbene alcune sindromi siano di difficile inquadramento clinico, i progressi della genetica molecolare sono riusciti a perfezionare le classificazioni delle sindromi lipodistrofiche.

La classificazione più recente è quella proposta da Chan e Oral (Tabella 1), secondo la quale le lipodistrofie vengono distinte in forme acquisite e forme congenite e subclassificate in generalizzate e parziali (13).

<u>FORME CONGENITE</u>	Generalizzate	Sindrome di Berardinelli-Seip: aspetto atletico, fenotipo acromegaloide, ernia ombelicale, IR e DM
	Parziali	Lipodistrofie parziali familiari: perdita di tessuto adiposo alle estremità, accumulo di tessuto adiposo a viso, collo e visceri. Sindrome di Dunnigan, Sindrome di Koberling
<u>FORME ACQUISITE</u>	Generalizzate	<ul style="list-style-type: none">• Sindrome di Lawrence (idiopatica)• Autoimmune• Associate a panniculiti• Associata a terapia antiretrovirale
	Parziali	Sindrome di Barraquer-Simmons: lipodistrofia parziale cefalo-toracica associata a ipocomplementemia e glomerulonefrite

Tabella 1: classificazione delle lipodistrofie

Forme acquisite

Le forme acquisite di lipodistrofia, delle quali in molti casi non è possibile determinare il fattore causale, si distinguono da quelle congenite poiché alla nascita gli individui affetti presentano una normale distribuzione del grasso corporeo e solo in risposta a specifiche condizioni patologiche (panniculiti, malattie autoimmuni, infezioni virali) sviluppano la malattia.

Tra le varie forme di lipodistrofia acquisita parziale, la più conosciuta è la Sindrome di Barraquer-Simmons, che si manifesta intorno ai 10 anni di vita ed è preceduta da un episodio virale acuto; è caratterizzata da una perdita localizzata di grasso a livello del volto, estesa fino ad interessare anche il collo, le spalle, le braccia, il torace e la parte superiore dell'addome, mentre gambe e fianchi non vengono interessati. L'incidenza è tre volte maggiore negli individui di sesso femminile rispetto a quelli di sesso maschile, ed è generalmente associata ad altri disturbi quali ipocomplementemia (bassi livelli di C3, fattore che riveste un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria) e glomerulonefrite.

La lipodistrofia acquisita generalizzata ha esordio durante l'infanzia e l'adolescenza, come nella forma parziale sono gli individui di sesso femminile ad essere più colpiti. Generalmente l'insorgenza della malattia è graduale, può avvenire in mesi o anni, degenerando nella perdita

completa del grasso corporeo, anche a livello delle superfici palmari e plantari, conferendo ai soggetti affetti un aspetto atletico.

I disordini metabolici sono simili a quelli causati dalla lipodistrofia congenita generalizzata.

Forme congenite

Le forme congenite di lipodistrofia distinte anch'esse in parziali e generalizzate, sono caratterizzate da un' anomalia nella distribuzione del grasso corporeo fin dalla nascita. La lipodistrofia parziale familiare (FPLD) e la lipodistrofia congenita generalizzata (CGL o sindrome di Berardinelli-Seip) sono le forme primarie congenite.

La FPLD è un insieme eterogeneo di disturbi autosomici dominanti con diversi aspetti fenotipici. La forma più diffusa fu descritta da Dunnigan che osservò in più di 200 pazienti un fenotipo caratterizzato da una progressiva e graduale perdita di tessuto adiposo sottocutaneo nelle estremità, con inizio intorno alla pubertà o poco dopo, accompagnata da perdita variabile dei depositi di grasso a livello del tronco e del petto ed aumento a livello facciale, del collo, dei muscoli, del fegato e dei visceri (14-16). La forma più frequente è il tipo Dunnigan e la varietà più comune è il sottotipo FPLD2 a cui è associata la mutazione del gene per la lamina A/C (LMNA) localizzato in 1q21-22. Le lamine A e C sono

prodotti di splicing alternativi e sono espressi ubiquitariamente (17). Derivano da una famiglia di proteine che formano la matrice nucleare e sono localizzate all'interno della membrana nucleare stessa. E' ancora oggetto di discussione come mutazioni nel gene LMNA nella FLPD2, possano intervenire nel determinare l'alterazione della forma e della struttura del nucleo, della regolazione della trascrizione, del posizionamento dei pori nucleari e dell'organizzazione dell'eterocromatina. Studi condotti su topi portatori di mutazioni del gene LMNA, hanno indicato che il difetto si tradurrebbe nell'impossibilità del tessuto adiposo di rinnovarsi per incapacità dei preadipociti di differenziarsi in adipociti maturi e completamente funzionanti.

Inoltre è stata dimostrata l'esistenza di una varietà denominata FPLD3 caratterizzata dalla mutazione del recettore PPAR γ che regola il deposito di acidi grassi e il metabolismo del glucosio. Sono stati descritti tre pazienti con grave insulino-resistenza e mutazioni nel dominio di legame di PPAR γ , ognuno dei quali ha sviluppato diabete e ipertensione in giovane età (18). Inizialmente non erano stati riportati cambiamenti nella composizione corporea ma successive attente valutazioni hanno rivelato un'apprezzabile perdita di tessuto adiposo a livello delle estremità, in particolare delle natiche e un aumento dell'adiposità viscerale. E' stato

inoltre descritto il caso di una donna con una diversa mutazione di PPAR γ che presentava un fenotipo caratterizzato da diabete e ipertrigliceridemia associato a ipertensione borderline in assenza di acantosi nigricans (19).

Altra variante delle FLDP è la sindrome di Koberling, caratterizzata dalla perdita di tessuto adiposo confinata alle estremità e ai glutei.

1.2 LIPODISTROFIA CONGENITA GENERALIZZATA (CGL) O SINDROME DI BERARDINELLI-SEIP

La lipodistrofia congenita generalizzata o Sindrome di Berardinelli-Seip (BSCL) è una malattia rara a trasmissione autosomica recessiva descritta per la prima volta da Berardinelli nel 1954 in Brasile (20) e successivamente da Seip in Norvegia nel 1959 (21). La prevalenza stimata è di un caso su 10 milioni di nati vivi (22) e attualmente il numero di pazienti descritti in letteratura è di circa 200, sebbene si calcoli che la diagnosi venga posta solo in un quarto dei pazienti effettivamente affetti.

Le caratteristiche cliniche della sindrome (23, 24) sono riportate nella Figura 1.

La caratteristica principale è la totale o quasi totale lipoatrofia che coinvolge ogni livello di localizzazione del tessuto adiposo. In alcuni

pazienti si osserva tuttavia la persistenza del tessuto adiposo con azione meccanica (regione buccale, palmo delle mani, lingua, pianta dei piedi, regioni articolari).

L'insulino-resistenza con conseguente iperinsulinemia, anch'essa uno dei criteri maggiori della sindrome, tende a manifestarsi in età precoce evolvendo in diabete mellito conclamato prima della seconda-terza decade di vita. Clinicamente si manifesta con la presenza di acantosi che in questi pazienti può essere molto diffusa e conferire alla cute un aspetto verrucoso.

Altri aspetti caratteristici dei pazienti affetti da CGL sono il fenotipo acromegaloide che si manifesta con ingrossamento delle estremità e prognatismo, la presenza di ernia ombelicale, epatomegalia steatosica, splenomegalia, linfadenopatia e lesioni litiche delle ossa appendicolari (25-27). I soggetti affetti presentano inoltre una grave ipertrigliceridemia che può manifestarsi con la presenza di xantomi cutanei.

La lipoatrofia diffusa associata all'accumulo di trigliceridi a livello muscolare e la conseguente pseudoipertrofia muscolare, conferiscono ai pazienti un aspetto "atletico".

La localizzazione ectopica del grasso a livello epatico è responsabile dell'epatosteatosi che può evolvere in cirrosi che con le sue complicanze, rappresenta una delle più frequenti cause di morte.

CRITERI DIAGNOSTICI MAGGIORI

- Lipoatrofia di tronco e arti (aspetto "atletico", pseudoipertrofia muscolare, flebomegalia)
- Aspetto acromegaloide (prognatismo, ingrossamento delle estremità, gigantismo)
- Epatomegalia (steatosi → cirrosi)
- Ipertrigliceridemia
- Insulino-resistenza (acantosi)

CRITERI DIAGNOSTICI MINORI

- Cardiomiopatia ipertrofica
- Ritardo mentale o psicomotorio
- Irsutismo
- Pubertà precoce
- Cisti ossee delle ossa lunghe

MANIFESTAZIONI CLINICHE ASSOCIATE

- Ernia ombelicale
- Fame vorace
- Riduzione della fertilità femminile
- Soppressione dell'asse GH-IGF1

Van-Maldergem. Orphanet Encyclopedia. November 2001

Figura 1: criteri diagnostici della sindrome di Berardinelli-Seip (24, 25)

Tra le caratteristiche più rare della sindrome sono da segnalare la cardiomiopatia ipertrofica e il ritardo mentale (la cui patogenesi non è nota) che quando presenti, possono influenzare significativamente la qualità e la durata della vita dei pazienti (28, 29).

Frequentemente le donne affette presentano una riduzione della fertilità che non è stata invece descritta negli individui di sesso maschile, sebbene in entrambi i sessi sia stato descritto un ipogonadismo ipogonadotropo (4).

Inoltre nelle donne sono frequenti la pubertà precoce e il ritardo nella presentazione del menarca, con cicli successivi irregolari. La riduzione della fertilità, i segni di virilizzazione e la policistosi ovarica possono

essere messi in relazione con la condizione di iperinsulinemia (4).

Il tessuto adiposo negli ultimi decenni è stato studiato per quanto concerne la sua attività endocrino-metabolica e viene oggi considerato un organo vero e proprio che produce adipocitochine con azione autocrina, paracrina ed endocrina, in grado di influenzare in modo importante il metabolismo glucidico e lipidico.

Alcune delle complicanze metaboliche dei pazienti affetti da lipodistrofia potrebbero essere correlate all'assenza di adipocitochine, in particolar modo di leptina e adiponectina, che risultano nettamente ridotte nei pazienti affetti (30). Il ruolo fisiologico della leptina si esplica sia a livello del sistema nervoso centrale, con l'attivazione di meccanismi anoressizzanti, che a livello periferico dove migliora la sensibilità insulinica. Questi effetti positivi sul metabolismo glucidico vengono meno sia nel caso dell'obesità, in cui per motivi non del tutto chiariti si verifica una resistenza alla leptina, che nella lipodistrofia in cui i livelli sierici di leptina risultano estremamente bassi. Ciò crea un legame tra queste due condizioni apparentemente opposte ma metabolicamente molto simili.

In generale, i livelli sierici di adiponectina risultano inversamente correlati al grado di insulino resistenza e sono bassi nei pazienti diabetici, per cui si ritiene che l'ipoadiponectinemia contribuisca alla

patogenesi dell'insulino-resistenza e del diabete mellito nei pazienti lipodistrofici.

Nell'obesità l'eccesso di acidi grassi determina il loro accumulo nel fegato e nel muscolo e questo determina la comparsa di insulino-resistenza mentre nella lipodistrofia è l'assenza di tessuto adiposo che determina l'accumulo di trigliceridi ed acidi grassi direttamente a livello epatico e muscolare.

Le alterazioni del metabolismo lipidico sono strettamente associate alle alterazioni del metabolismo glucidico. A seguito della limitata capacità di accumulo nel tessuto adiposo, l'eccesso di glucosio viene conservato sottoforma di glicogeno e i pazienti affetti da sindrome di Berardinelli-Seip hanno una quantità abbondante di glicogeno sia a livello epatico che a livello muscolare e cardiaco.

1.3 CARATTERISTICHE GENETICHE DELLA CGL

I geni responsabili del 95% dei casi di lipodistrofia congenita generalizzata sono l'1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasi beta (AGPAT2) e il gene denominato Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (BSCL2) (31,32). Oltre a questi due geni, sembra che anche il gene della *caveolina* e il gene PTRF possano essere considerati responsabili di una piccola percentuale dei casi di BSCL riscontrati (33-

35).

BSCL2, localizzato sul cromosoma 11q13 ed espresso a livello di tessuto adiposo, fegato, muscolo e sistema nervoso centrale, codifica per una proteina di 398 amminoacidi localizzata a livello del reticolo endoplasmatico chiamata seipina, che sembra coinvolta nei processi di differenziamento adipocitario e formazione della goccia lipidica (Figura 2).

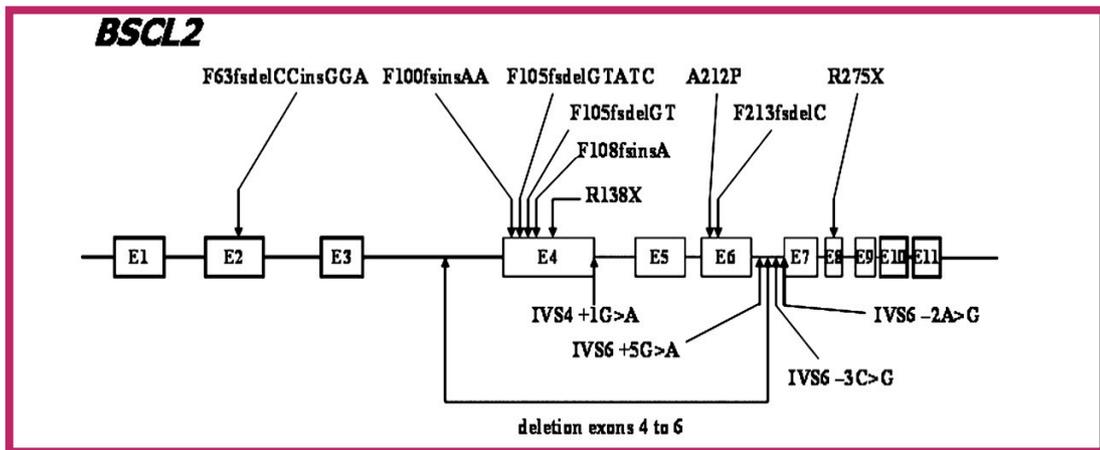


Figura 2: struttura del gene BSCL2

Il ruolo di BSCL2 è stato studiato mediante esperimenti in cui, reprimendone l'espressione attraverso la tecnica dell'RNA interference, è stata osservata una riduzione dell'espressione di fattori di trascrizione fondamentali per il differenziamento adipocitario, come PPAR γ e C/EBP β , e la riduzione dell'espressione di enzimi coinvolti nella sintesi dei trigliceridi (36).

AGPAT2, localizzato sul cromosoma 9q34 ed espresso a livello di tessuto adiposo, fegato e muscolo, codifica per l'acilglicerolo-3-fosfoaciltransferasi, enzima di 278 amminoacidi (Figura 3) che svolge un ruolo cruciale nella sintesi dei trigliceridi catalizzando la reazione di conversione dell'acido lisofosfatidico in fosfatidato (37).

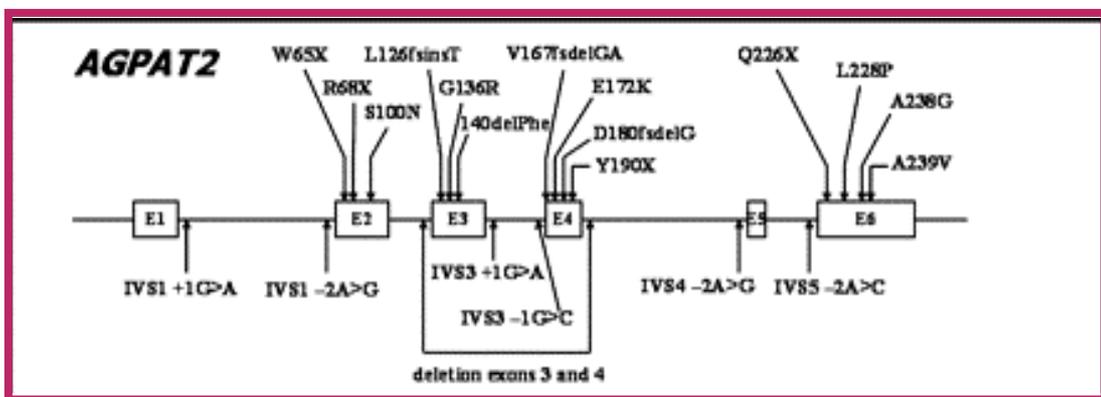


Figura 3: struttura del gene AGPAT2

Oltre ad avere un'importanza cruciale nella sintesi di trigliceridi e fosfolipidi, AGPAT2 partecipa anche alla determinazione della curvatura della membrana plasmatica e al reclutamento di proteine citosoliche su appropriate membrane endocellulari (38) (Figura 4).

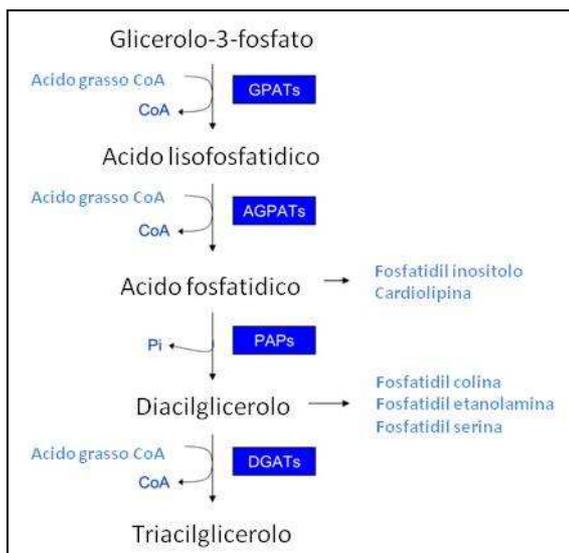


Figura 4: ruolo di AGPAT2 nella sintesi dei trigliceridi, da (38) modificata.

Come per BSCL2, anche per AGPAT2 sono stati condotti studi per determinarne il ruolo nell'adipogenesi, che hanno dimostrato come la mancata espressione del gene si traduca in una marcata riduzione dell'espressione di C/EBP β e in un ritardo nell'espressione di PPAR γ (39).

Inoltre per AGPAT2 sono noti anche i meccanismi che portano alla deposizione ectopica di trigliceridi a livello muscolare ed epatico (40) (Figura 5).

Quindi qualunque dei due geni sia coinvolto, il risultato è un'alterazione dei processi che portano alla formazione dell'adipocita maturo e a una riduzione della capacità da parte dell'adipocita di formare la goccia lipidica.

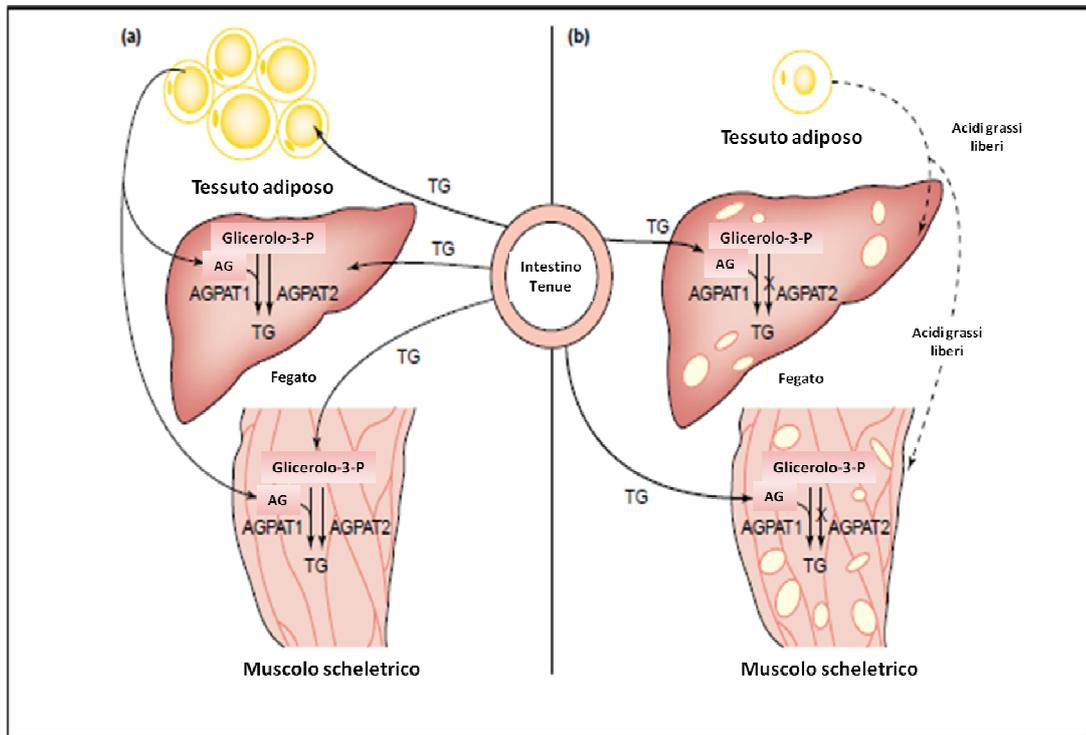


Figura 5: localizzazione ectopica dei trigliceridi nel tessuto muscolare e nel fegato nella lipodistrofia congenita generalizzata provocata da mutazione di AGPAT2, da (40) modificata.

Le caratteristiche principali della sindrome, come la lipotrofia generalizzata, l'insulino-resistenza, l'ipoleptinemia e l'ipoadiponectinemia, sono presenti in tutti i pazienti affetti. Esiste però una variabilità per quanto riguarda la frequenza e le modalità di presentazione degli altri segni e sintomi (41) (Tabella 2). È riportata infatti una differenza nel modo di manifestarsi della sindrome in relazione a quale dei due geni presenti la mutazione.

AGPAT2	BSCL2
Lipoatrofia ; DM tipo II; ipoleptinemia; Ipoadiponectinemia; Ipertrigliceridemia; Acantosi; Ernia ombelicale.	
+ donne	+ uomini
	Manifestazioni cliniche più gravi
Ritardo mentale assente	Ritardo mentale presente(78%)
	Sviluppo più precoce di DM e IR
	Maggior frequenza di cardiopatia

Tabella 2: relazione tra genotipo e fenotipo nella sindrome di Berardinelli-Seip

I pazienti portatori di mutazioni a carico di BSCL2 sono più frequentemente uomini ed hanno una prognosi peggiore dovuta ad una più precoce manifestazione del diabete e delle sue complicanze, alla frequente presenza di ritardo mentale e di cardiomiopatia ipertrofica. Inoltre in questi pazienti anche la lipoatrofia è più grave, coinvolgendo anche il tessuto adiposo con funzione meccanica.

I pazienti affetti da mutazione di AGPAT2 non presentano mai ritardo mentale e solo raramente cardiopatia ipertrofica, mentre loro caratteristica esclusiva è la presenza di cisti a livello delle ossa lunghe.

CASO CLINICO

Una donna di 54 anni, giungeva all'attenzione del Dipartimento di Endocrinologia nel luglio 2009 per diabete mellito di tipo 2 diagnosticato a circa 30 anni di età e al momento in terapia con insulina.

La paziente riferiva una storia di acromegalia da adenoma ipofisario GH secernente, i cui segni si erano manifestati a partire dall'infanzia e che era stato trattato all'età di 30 anni con adenomectomia senza miglioramento dei sintomi in seguito all'intervento. Non era disponibile documentazione relativa alla funzione ipofisaria precedente all'intervento né l'esame istologico. Successivamente era stata posta diagnosi di deficit di GH ma non era stata consigliata alcuna terapia.

Era inoltre presente ipertensione arteriosa per la quale effettuava terapia farmacologica nonché ipertrigliceridemia e ipercolesterolemia non trattate.

Per quanto riguarda l'anamnesi fisiologica la paziente aveva presentato il menarca all'età di 10 anni e mezzo, con cicli di ritorno regolari e menopausa spontanea a 45 anni, per la quale non aveva effettuato terapia ormonale sostitutiva. Non aveva avuto gravidanze né aborti. La scolarità era stata regolare e svolgeva la professione di insegnante elementare.

Riferiva una familiarità per diabete mellito tipo 2; da segnalare che i

genitori della paziente erano consanguinei (cugini di primo grado).

All'esame obiettivo si presentava in discrete condizioni generali, con un indice di massa corporea di 22,6 Kg/m², la pressione era di 130/80 mmHg e la frequenza cardiaca di 72 bpm.

L'aspetto che più colpiva era una lipoatrofia diffusa del tessuto adiposo sottocutaneo ed uno sviluppo delle masse muscolari apparentemente atletico, benché la paziente non praticasse alcun tipo di attività fisica. Inoltre presentava delle caratteristiche acromegaloidi (prognatismo, ingrossamento delle estremità) con un'altezza nei limiti della norma (1,60 cm). L'assenza del tessuto adiposo non coinvolgeva le zone ad azione prettamente meccanica come il palmo delle mani e la pianta dei piedi.

La paziente riferiva e documentava attraverso alcune fotografie l'assenza del tessuto adiposo sottocutaneo e le caratteristiche acromegaloidi fin dall'infanzia.

Era presente inoltre una piccola ernia ombelicale e un'importante acantosi a livello retronucale.

All'ecografia dell'addome veniva segnalata la presenza di epatosteatosi, mentre la valutazione cardiologica risultava nella norma.

L'esame radiologico degli arti mostrava la presenza di cisti omerali e femorali (Figura 6).



Figura 6: presenza di cisti omerali all'esame radiologico.

La densitometria a raggi X a doppio fotone (DEXA) permetteva di calcolare una massa grassa totale pari a 17,7%. Il rapporto tra la percentuale di massa grassa del tronco e quella degli arti inferiori (FMR) era pari a 1,19 (42).

Gli esami ematochimici indicavano lo scarso controllo del diabete mellito (glicemia basale 295 mg/dl, Hb glicata 9,6%) con ipercolesterolemia (250 mg/dl) e ipertrigliceridemia (329 mg/dl).

La valutazione ormonale mostrava una normale funzione tiroidea (FT4 8,9 pg/ml; FT3 3,73 pg/ml; TSH 0,655 uU/ml; AbTg e AbTPO assenti), surrenalica (ACTH 49 pg/ml; cortisolo 203 ng/ml) e un normale metabolismo fosfo-calcico (Ca^{++} 1,18 mmol/l; PTH 62 pg/ml; 25OHvitD 23,9 ng/ml). Veniva confermata la presenza del deficit di GH (GH 0,16 ng/ml [0,05-5]; IGF1 93 ng/ml [71-290]). La funzione gonadica era compatibile con menopausa da insufficienza ovarica primitiva (FSH 39,9 mU/ml; LH 22 mU/ml; estradiolo <18 pg/ml).

Veniva inoltre dosata la leptina che risultava di 0,76 ng/ml, un valore estremamente basso considerando il range di riferimento per l'indice di massa corporea della paziente (1,5-30 ng/ml); anche i livelli sierici di adiponectina risultavano particolarmente bassi (1,10 ng/ml).

Il particolare aspetto della paziente ed in particolar modo la lipoatrofia diffusa, la presenza di epatosteatosi, il diabete mellito tipo 2, l'insulino-resistenza, l'ipertrigliceridemia, l'ipoleptinemia e l'ipoadiponectinemia, orientavano verso una condizione di lipodistrofia ed in particolare verso una lipodistrofia congenita generalizzata, ovvero la Sindrome di

Berardinelli Seip.

Il nostro compito è stato quello di confermare tale sospetto attraverso sequenziamento dei due geni candidati.

Il DNA della paziente è stato estratto da leucociti di sangue periferico utilizzando il metodo di estrazione automatico Maxwell (Promega Corporation - USA), e amplificato mediante PCR (PCR Master Mix , Promega Corporation – USA) secondo il protocollo di seguito riportato: denaturazione a 94°C per 40 sec, annealing a 55°C per 1 min, allungamento a 72°C per 1,30 min per un totale di 35 cicli.

I primers utilizzati per l'amplificazione sono stati disegnati utilizzando il programma Primer 3.

Gli amplificati sono stati sequenziati mediante metodo automatico (ABI 3130 XL).

Dallo screening genetico non è risultata alcuna mutazione a carico di BSCL2, mentre è stata riscontrata una mutazione omozigote nell'esone 3 del gene AGPAT2 (Figura 7) che comporta la sostituzione di una prolina in posizione 112 con una leucina (P112L).

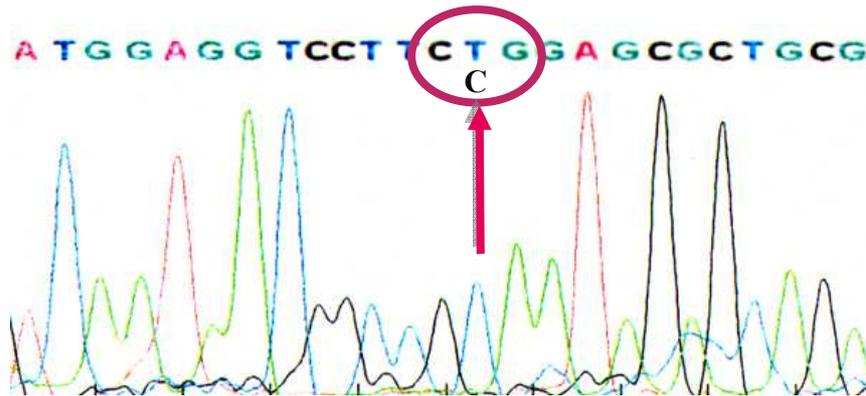


Figura 7: elettroferogramma che mostra la mutazione P112L ritrovata a livello del codone 112 dell'esone 3 del gene AGPAT2

Dopo aver riscontrato la presenza di questa mutazione, abbiamo ricostruito per quanto possibile, l'albero genealogico dei familiari della paziente analizzando la sequenza di AGPAT2 della madre e di uno dei due fratelli della donna, entrambi asintomatici. I risultati dello screening hanno evidenziato la presenza della mutazione in forma eterozigote in entrambi i soggetti (Figura 8).

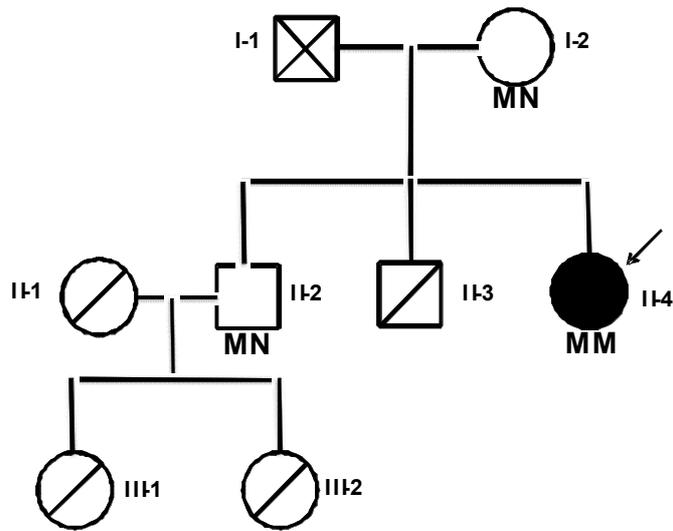


Figura 8: pedigree e genotipo dei membri della famiglia del soggetto affetto da CGL (indicato da una freccia). Il genotipo AGPAT2 dei membri della famiglia, se disponibile, è mostrato sotto ogni simbolo. Il cerchio di colore nero indica il soggetto con CGL, M l'allele mutato (P112L), N l'allele normale, X i soggetti defunti, il simbolo / i soggetti non esaminati.

Come controllo, l'analisi genetica è stata condotta in 100 soggetti di razza caucasica non affetti da lipodistrofia, senza rilevare alcuna mutazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Abbiamo descritto il primo caso italiano di lipodistrofia congenita generalizzata causata da una mutazione omozigote a carico di AGPAT2, gene che riveste un ruolo di notevole importanza nel processo di adipogenesi e la cui attività enzimatica è alla base dell'accumulo di lipidi a livello dell' adipocita maturo (43).

Ad oggi buona parte degli individui che presentano una mutazione di AGPAT2, provengono dall'Africa sub-Sahariana, dal Maghreb e in piccola parte dagli stati centro-orientali del nord Europa (44). La mutazione trovata nella paziente da noi studiata, riguarda l' esone 3 del gene AGPAT2 ed è caratterizzata dalla sostituzione di una citosina con una timina a livello del codone 112 che si traduce a livello amminoacidico nella sostituzione di una prolina con una leucina (P112L).

La stessa variante allelica è stata trovata in una donna Afro-Americana affetta da lipodistrofia congenita generalizzata, in eterozigosi composta con una mutazione a carico del sito di splicing dell'introne 4 (IV S4-2A>G); lo studio funzionale della doppia mutazione, metteva in evidenza una riduzione dell'attività enzimatica di AGPAT2 pari al 70%. (45). Magrè e colleghi avevano precedentemente dimostrato come la

variante intronica già in forma eterozigote, fosse in grado di determinare il fenotipo lipodistrofico (32).

Ciò significa che P112L di per sé non è in grado, se presente in forma eterozigote, di determinare l'insorgenza della BSCL. Da questi dati possiamo dedurre che la paziente giunta alla nostra osservazione rappresenta il primo caso di individuo portatore della mutazione P112L in forma omozigote non associata ad altre varianti alleliche compresa IV S4-2A>G.

Approccio terapeutico e CGL

Il primo approccio terapeutico nei pazienti affetti da CGL consiste nel programmare una dieta strettamente controllata, basata sulla riduzione dei carboidrati e con un'assunzione di grassi regolata per minimizzare la deposizione ectopica di trigliceridi (24). La limitazione dell'introito calorico può essere utile nei tempi brevi ma non è una modalità terapeutica utile nel lungo termine.

La metformina, ove necessario in associazione con insulina, è il farmaco antidiabetico orale di prima scelta in questi pazienti perché determina un miglioramento del profilo glicemico attraverso l'effetto sensibilizzante all'insulina, con miglioramento della funzione ovarica e della steatosi epatica. La metformina può inoltre determinare una diminuzione

dell'appetito e conseguentemente favorire l'adesione alle prescrizioni dietetiche.

La possibilità di produrre leptina ricombinante umana (metreleptina) ha aumentato notevolmente le prospettive di trattamento di questa sindrome. Molti studi hanno dimostrato gli effetti positivi della somministrazione di leptina ricombinante umana in soggetti affetti da sindrome di Berardinelli Seip, consentendo di sospendere completamente la terapia antidiabetica nella maggior parte dei pazienti, riducendo la dose dei vari farmaci nei rimanenti. E' stata anche descritta una riduzione delle dimensioni del fegato, accompagnata da un miglioramento degli indici di danno epatico (1, 46, 47).

BIBLIOGRAFIA

- 1. Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI.** *Lipoatrophy revisited. Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:410-416.
- 2. Reue K, Phan J.** Metabolic consequences of lipodystrophy in mouse models. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*2006;9:436-441.
- 3. Hegele RA.** Premature atherosclerosis associated with monogenic insulin resistance. *Circulation* 2001; 103:
- 4. Oral EA, Ruiz E, Andewelt A, Sebring N, Wagner AJ, Depaoli AM, Gorden P.** Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:3110-3117.
- 5. Javor ED, Moran SA, Young JR, Cochran EK, DePaoli AM, Oral EA, Turman MA, Blackett PR, Savage DB, O'Rahilly S, Balow JE, Gorden P.** Proteinuric nephropathy in acquired and congenital generalized lipodystrophy: baseline characteristics and course during recombinant leptin therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:3199-

3207.

6. Meyrier A. The patient with glomerulonephritis and lipodystrophy. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12:226-227.

7. Casali RE, Resnick J, Goetz F, Simmons RL, Najarian JS, Kjellstrand C. Renal transplantation in a patient with lipoatrophic diabetes: a case report. *Transplantation.* 1978; 26:174-177

8. Godoy-Matos AF, Moreira RO, MacDowell R, Bendet I, Mory PB, Moises RS. Serum retinol binding protein 4 in patients with familial partial lipodystrophy. *Clin Biochem.* 2009; 42:1183-1186.

9. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:2395.

10. Wong SP, Huda M, English P, Bargiotta A, Wilding JP, Johnson A, Corrall R, Pinkney JH. Adipokines and the insulin resistance syndrome in familial partial lipodystrophy caused by a mutation in lamin A/C. *Diabetologia* 2005; 48: 2641-2649

11. Heidemann C, Sun Q, van Dam RM, Meigs JB, Zhang C, Tworoger SS, Mantzoros CS, Hu FB. Total and high-molecular-weight adiponectin and resistin in relation to the risk for type 2 diabetes in women. *Ann Intern Med.* 2008; 149:307-316.

12. Brennan AM, Mantzoros CS. Leptin and adiponectin: their role in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2007; 7:1-2.

13. Chan JL, Oral EA. Clinical Classification and treatment of congenital and acquired lipodystrophy. *Endocr Pract,* 2010; 16: 310-323

14. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab.*1999; 84:170-174.

15. Garg A. Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:1776-1782.

16. Lüdtke A, Genschel J, Brabant G, Bauditz J, Taupitz M, Koch M,

Wermke W, Worman HJ, Schmidt HH. Hepatic steatosis in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:2218-2224.

17. Wilson KL. The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol.* 2000; 10:125-129.

18. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature.* 1999; 402:880-883.

19. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:408-411.

20. Berardinelli W. An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of two cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1954; 14: 193-204.

- 21. Seip M.** Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations: a new diencephalic syndrome? *Acta Paediatr Scand* 1959; 48:555-74.
- 22. Garg A, Wilson R, Barnes R, Arioglu E, Zaidi Z, Gurakan F, Kocak N, O'Rahilly S, Taylor SI, Patel SB, Bowcock AM.** A gene for congenital generalized lipodystrophy maps to human chromosome 9q34. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:3390-3394
- 23. Van Maldergem L.** Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy, *Orphanet encyclopedia* 2010; 1993-2003
- 24. Gomes KB, Cavalcanti Pardini V, Fernandes AP.** Clinical and molecular aspects of Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy, *Clinica Chimica Acta*, 2009; 402:1-6
- 25. Seip M, Trygstad O.** Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatr Suppl.* 1996; 413:2-28.
- 26. Westvik J.** Radiological features in generalized lipodystrophy. *Acta Paediatr Suppl.* 1996; 413:44-51.

27. Fleckenstein JL, Garg A, Bonte FJ, Vuitch MF, Peshock RM. The skeleton in congenital, generalized lipodystrophy: evaluation using whole-body radiographic surveys, magnetic resonance imaging and technetium-99m bone scintigraphy. *Skeletal Radiol.* 1992; 21:381-386

28. Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O'Rahilly S, Zaidi Z, Gurakan F, Arslanian SA, Klar A, Ricker A, White NH, Bindl L, Herbst K, Kennel K, Patel SB, Al-Gazali L, Garg A. Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4840-4847.

29. Bhayana S, Siu VM, Joubert GI, Clarson CL, Cao H, Hegele RA. Cardiomyopathy in congenital complete lipodystrophy. *Clin Genet.* 2002;61:283-287.

30. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies, *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:2395.

31. Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI,

Bowcock AM, Barnes RI, Garg A. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* 2002; 31:21–23.

32. Magré J, Delépine M, Van Maldergem L, Robert JJ, Maassen JA, Meier M, PanzVR, Kim CA, Tubiana-Rufi N, Czernichow P, Seemanova, E Buchanan CR, Lacombe D, Vigouroux C, Lascols O, Kahn CR, Capeau J, Lathrop M. Prevalence of mutations in AGPAT2 among human lipodystrophies. *Diabetes* 2003; 52:1573-1578.

33. Simha V, Agarwal AK, Aronin PA, Iannacone ST, Garg A. Novel subtype of congenital generalized lipodystrophy associated with muscular weakness and cervical spine instability. *Am J Med Genet* 2008; 146A: 2318-26.

34. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park Y-E, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginiya K, Sugano H, Nishino I. Human PTFR mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized

lipodystrophy. *J Clin Invest* 2009; 93: 1129-33.

35. Agarwal AK, Barnes RI, Garg A. Genetic bases of congenital generalized lipodystrophy. *International Journal of Obesity* 2004; 28: 336-339.

36. Payne VA, Grimsey N, Tuthil A, Virtue S, Gray SL, Della Nora E, Semple RK, O’Rahilly S, Rochford J. *Diabetes* 2008; 57: 2055-2060.

37. Agarwal AK and Garg A. Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14:214-221.

38. Garg A, Agarwal AK. Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1791:507-13.

39. Gale SE, Frolov A, Han X, Bickel PE, Cao L, Bowcock A, Schaffer JE, Ory DS. A regulatory role for 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 in adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:11082-11089.

40. Agarwal AK and Garg A. Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. 2003. *Trends in endocrinology and metabolism.* 14: 214-221

41. Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O'Rahilly S, Zaidi Z, Gurakan F, Arslanian SA, Klar A, Ricker A, White NH, Bindl L, Herbst K, Kennel K, Patel SB, Al-Gazali L, Garg A. Phenotypic and Genetic Heterogeneity in Congenital Generalized Lipodystrophy, *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4840-4847.

42. Valerio CM, Godoy-Matos A, Moreira RO, Carraro L, Guedes EP, Moises RS, MoryPB, de Souza LL, Russo LA, Melazzi AC. Dual-energy X-ray absorptiometry study of body composition in patients with lipodystrophy. *Diabetes Care.* 2007; 30:1857-1859.

43. Gale SE, Frolov A, Han X, Bickel PE, Cao L, Bowcock A, Schaffer JE, Ory DS. A regulatory role for 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2006; 281:11082-11089.

44. Van Maldergem L, Magrè J, Khallouf TE, Gedde-Dahl T Jr, Delèpine M, Trygstag O, Seemanova E, Stephenson T, Albott CS, Bonnici F, Panz VR, Medina JL, Boghalo P, Huet F, Savasta S, Verloes A, Robert JJ, Loret H, De Kerdanet M, Tubiana-Rufi N, Mègarbanè A, Maassen J, Polak M, Lacombe D, Kahn CR, Silveira EL, D'Abronzo FH, Grigorescu F, Lathrop M, Capeau J, O'Rahilly S. Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Med Genet* 2002; 39:722-733.

45. Taleban S, Carew HT, Dichek HL, Deeb SS, Hollenback D, Weigle DS, Cummings DE, Brunzell JD Energy balance in congenital generalized lipodystrophy type I. *Metabolism* 2008; 57:1155–1161

46. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med.* 2002; 346:570-578.

47. Ebihara K, Kusakabe T, Hirata M, Masuzaki H, Miyanaga F, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda

K, Ogawa Y, DePaoli AM, Fukushima M, Nakao K. Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:532-541.