ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Workshop

Fattori genetici e nutrizionali nella patogenesi dell'obesità e delle sue complicanze

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 22 ottobre 2004

Atti a cura di
Massimo D'Archivio e Roberta Masella

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
05/17

Istituto Superiore di Sanità
Workshop. Fattori genetici e nutrizionali nella patogenesi dell'obesità e delle sue complicanze. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 22 ottobre 2004
Atti a cura di Massimo D'Archivio e Roberta Masella
2005, 51 p. Rapporti ISTISAN 05/17

L'obesità rappresenta un importante problema sanitario in virtù del progressivo aumento della sua prevalenza e della sua associazione con malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2 e ipertensione, per le quali costituisce il principale fattore di rischio. L'obesità è una patologia ad eziologia multifattoriale in cui la predisposizione genetica e i fattori ambientali, in particolare la non corretta alimentazione, hanno un ruolo fondamentale; nonostante ciò, le conoscenze sul ruolo dei fattori e dei meccanismi fisiologici e molecolari, con i quali essi esercitano i loro effetti, sono ancora limitate e incomplete. Le alterazioni metaboliche associate all'obesità (stress ossidativo, aumento di leptina, produzione di citochine, aumento di acidi grassi liberi) potrebbero rappresentare possibili *link* fra essa e le sue complicanze, ma i meccanismi attraverso i quali tali rapporti si instaurano necessitano di ulteriori studi. Infatti, soltanto una più ampia comprensione dei meccanismi patogenetici, può offrire la base necessaria per efficaci interventi terapeutici.
Parole chiave: Obesità, Diabete di tipo 2, Alimentazione, Adipociti

Istituto Superiore di Sanità
Workshop. Nutritional and genetic factors involved in the obesity and in its clinical complications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, October 22, 2004.
Proceedings edited by Massimo D'Archivio and Roberta Masella
2005, 51 p. Rapporti ISTISAN 05/17 (in Italian)

Obesity is an important public health problem, because of the growing increase of its prevalence; it also represents the most important risk factor for type 2 diabetes, cardiovascular disease and hypertension. Obesity is a multifactorial pathology: genetic and environmental factors, in particular incorrect diet, play a key role; even so our knowledge on the role of physiological and molecular mechanisms involved in this pathology is still limited. The metabolic alterations associated to obesity (oxidative stress, leptin increase, cytokine production, free fatty acids increase) could represent possible links between obesity and its clinical complications: more studies are needed to better understand the mechanisms of these links. A wide-ranging understanding of its pathogenetic mechanisms is necessary for effective therapeutic interventions.
Key words: Obesity, Type 2 diabetes, Diet, Adipocytes

Per informazioni su questo documento scrivere a: maxdar@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione*: Paola De Castro, Sara Modigliani* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

Nutrizione, obesità e salute. Stili di vita
Michele O. Carruba 1

Basi nutrizionali dell'obesità in età pediatrica
Marcello Giovannini, Silvia Scaglioni 6

Effetti della dieta sulla sensibilità insulinica
Gabriele Riccardi, Michele Iaccarino, Lara Bruno, Rosalba Giacco 9

Effetto di comuni polimorfismi in geni candidati sulla perdita di peso in soggetti morbidamente obesi sottoposti a bendaggio gastrico
Giorgio Sesti 13

Tessuto adiposo, insulino-resistenza e lipemia postprandiale in soggetti obesi con e senza diabete
Giovanni Annuzzi, Rosalba Giacco, Lidia Patti, Lucrezia Di Marino, Claudia De Natale, Valentina Minerva, Roberta Masella, Carmela Santangelo, Gabriele Riccardi, Angela A. Rivellese 18

Effetto delle statine sull'insulino-resistenza in pazienti con obesità severa: valutazione dei possibili meccanismi d'azione
Maria Elisa Berselli, Sabrina Maestrini, Giulio Savia, Alessandro Minocci, Amelia Brunani, Anna Maria Di Blasio, Antonio Liuzzi 24

Riduzione dell'obesità e fattori di rischio cardiovascolare
Roberto Lorenzet 28

L'iperinsulinismo cronico inibisce la captazione del glucosio in mioblasti umani
Anna Bertacca, Annamaria Ciccarone, Paolo Cecchetti, Barbara Vianello, Incoronata Laurenza, Margherita Maffei, Chiara Chiellini, Stefano Del Prato, Luca Benzi 32

Effetti della leptina sull'omeostasi del sistema immunitario
Benedetta Mattioli, Maria Giovanna Quaranta, Luciana Giordani, Marina Viora 36

LDL ossidate modulano l'adipogenesi alterando l'equilibrio tra proliferazione cellulare e differenziamento
Roberta Masella, Beatrice Scazzocchio, Rosaria Varì, Carmela Santangelo, Carmela Filesi, Roberta Di Benedetto, Massimo D'Archivio, Claudio Giovannini 44

NUTRIZIONE, OBESITÀ E SALUTE. STILI DI VITA

Michele O. Carruba
Centro di Studio e Ricerca sull'Obesità, Università degli Studi di Milano, Milano

Introduzione

"L'emergenza" obesità ha assunto oramai le dimensioni di un'epidemia ed è diventata la prima causa di morte prevenibile, come indicato da un recente studio in cui si evidenzia che un elevato indice di massa corporea è direttamente correlato all'aumentato rischio di morte per tutti i tipi di tumore studiati (esofago, colon, retto, rene, fegato pancreas, colecisti, linfoma non-Hodgkin, mieloma multiplo) (1).

L'obesità rappresenta inoltre il più importante fattore di rischio sia per il diabete di tipo 2 che per le patologie cardiovascolari: infatti, circa il 90% dei diabetici di tipo 2 è obeso (2), e gli obesi hanno rischi maggiori di sviluppare morte improvvisa, ictus, insufficienza cardiaca e coronaropatie rispetto alla popolazione normale (3).

È importante sottolineare che non solo il soggetto obeso è maggiormente a rischio di sviluppare alcune malattie, ma sempre più spesso il paziente affetto da queste malattie è anche obeso o in sovrappeso. La tendenza attuale spinge verso una valutazione complessiva della situazione del paziente: ci si riferisce infatti alla cosiddetta "sindrome plurimetabolica", proprio per includere nel quadro clinico tutte le componenti patologiche in modo che non ci sia una visione settoriale offerta dal singolo specialista.

La sindrome plurimetabolica è una sorta di patologia "trasversale" che sintetizza tutte le alterazioni che possono essere associate all'eccesso di peso: obesità, diabete, ipertensione e dislipidemia. Oggi essa rappresenta una delle maggiori cause di morbidità, mortalità e deterioramento della qualità della vita.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha lanciato l'allarme, definendo l'obesità *globesity*, per sottolineare come questa patologia sia oramai un fenomeno sociale e culturale non solo dei Paesi industrializzati ma anche di molti di quelli in via di sviluppo, che riguarda indistintamente tutte le fasce di età e le classi sociali. La prevalenza dell'obesità negli Stati Uniti è praticamente raddoppiata in un decennio, passando dal 10-14% del 1991 a più del 20% del 2000 (4).

Attualmente anche in Italia si può parlare di una vera e propria epidemiologia dell'obesità: secondo l'ultimo *Rapporto italiano sull'obesità* realizzato dall'Istituto Auxologico Italiano (5) circa il 45% della popolazione italiana è soprappeso/obeso, circa il 10% è obeso, un'epidemia crescente al ritmo del 25% ogni 5 anni (Figura 1).

Figura 1. Distribuzione della popolazione italiana nelle varie condizioni di peso

Il medesimo Rapporto indica che la prevalenza dell'obesità è maggiore al Sud e nelle Isole, e che le fasce d'età maggiormente colpite sono quella fra i 55-64 anni per gli uomini e fra i 65-74 anni per le donne.

Cause dell'obesità

L'obesità è determinata da un insieme di fattori genetici, organici e ambientali. Tra questi ultimi, detti anche fattori esogeni, l'alimentazione, il consumo di alcool e la sedentarietà hanno sicuramente un ruolo fondamentale, i quali però da soli non sono sufficienti a giustificare un fenomeno di così vasta portata. Non si può, infatti, non considerare l'importanza della predisposizione individuale ad ingrassare, spesso determinata da cause organiche, così come dalla familiarità dovuta all'ereditarietà genetica. Poiché sui fattori genetici ancora non si riesce ad intervenire, si deve invece cercare di agire modificando quelli ambientali, primo fra tutti l'alimentazione.

Fattori esogeni

A conferma di come l'alimentazione influenzi lo stato di salute, un'indagine condotta su più di 22 mila soggetti adulti (6) ha evidenziato che coloro che seguono la dieta mediterranea hanno un rischio minore di mortalità per tutte le cause.

La scarsa conoscenza dei meccanismi fisiologici che determinano una condizione di obesità e la riluttanza a modificare il proprio stile di vita finiscono per porre sul banco degli imputati solo l'alimentazione, mentre la mancanza di esercizio fisico rimane impunita. Il movimento invece è un fattore essenziale: il muscolo è il tessuto più abbondante del corpo ed è il luogo di maggior consumo di glucosio.

Per il controllo del peso e per il benessere fisico molti esperti raccomandano di svolgere una moderata attività fisica per almeno 30 minuti al giorno, quasi tutti i giorni, ma anche essere semplicemente meno sedentari può aiutare.

Purtroppo lo sviluppo della tecnologia negli ultimi anni ha ridotto sempre di più le occasioni di movimento facendo della sedentarietà uno stile di vita. Fare le scale invece di usare l'ascensore, non usare il telecomando della TV o tantomeno quello del cancello automatico, percorrere a piedi le piccole distanze quotidiane, pur essendo piccoli gesti, possono contribuire a stimolare la ripresa di un'attività fisica spontanea ottenendo un primo miglioramento dello stato psicofisico. Come esempio si consideri che il semplice spostamento del telefono dalla propria scrivania ad un'altra stanza porterebbe a percorrere circa 100 km ogni anno, equivalenti a 10.000 kcal, con una diminuzione di 2,5 kg di peso corporeo ogni anno. In aggiunta si consideri che è molto più facile, per chi ha problemi di peso, impegnarsi costantemente in attività quotidiane a basso consumo energetico, piuttosto che nella pratica sporadica di un faticoso sport anaerobico che, oltretutto, viene più facilmente abbandonato. A tal riguardo va anche sottolineato che la pratica di uno sport faticoso, ma saltuario, molto spesso è causa di una alternanza di periodi di dimagrimento e ripresa del peso, con ripercussioni negative sulla salute e sulla qualità della vita.

Recenti analisi della situazione italiana riportano una drammatica riduzione del movimento fisico nei giovani in crescita: il passaggio dalle scuole elementari alle medie segna un abbandono dei giochi all'aperto, associato a un aumento dei casi di sovrappeso e al rischio di sviluppare obesità. In particolare il numero di ore trascorse davanti alla televisione risulta direttamente correlato al rischio di sviluppare obesità (Figura 2).

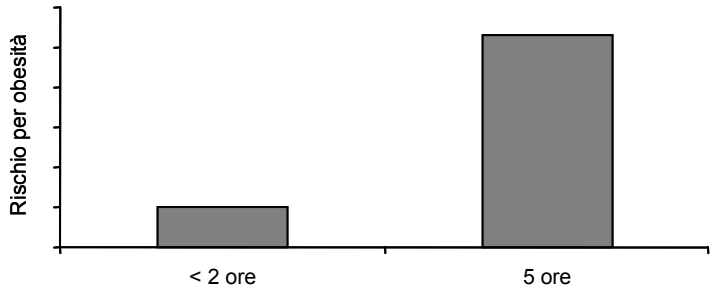

Figura 2. Tempo quotidiano dedicato alla TV e rischio di obesità in bambini di 6-10 anni (dati pareggiati per livello socioeconomico)

Riducendo il tempo dedicato alla TV in bambini di 3ª e 4ª elementare, si aveva una significativa riduzione sia dell'indice di massa corporea che della circonferenza-vita (7).

I dati sui bambini sono estremamente preoccupanti purché l'obesità infantile è fortemente predittiva dell'obesità nell'adulto, soprattutto quando uno o più familiari sono obesi (8) (Tabella 1).

Tabella 1. Prevalenza di obesità nell'adulto in base all'obesità infantile, suddivisa per età e familiarità

Età	Nessun familiare obeso	Almeno un familiare obeso
3-5 anni	24%	62%
10-14 anni	64%	79%

Fattori endogeni

La predisposizione individuale ha sicuramente un ruolo fondamentale nell'insorgenza dell'obesità: numerosi studi hanno evidenziato alcuni dei geni che possono essere coinvolti in questa patologia, anche se è difficile, per ora, ipotizzare una possibile terapia genetica a breve termine.

Uno degli ultimi studi eseguiti presso il Centro di Studio e Ricerca sull'Obesità dell'Università di Milano (9) ha individuato un meccanismo corresponsabile dell'obesità e della sindrome metabolica, in cui sono direttamente coinvolti i mitocondri. La principale funzione dei mitocondri è rappresentata dalla trasformazione delle sostanze nutritive introdotte nel nostro organismo in energia necessaria per tutte le funzioni vitali: questo avviene in tutte le cellule, ma soprattutto nelle cellule adipose. È noto che negli obesi queste cellule sono piuttosto "pigre" a causa di una scarsa attività dei mitocondri. Di conseguenza tutte le sostanze nutritive ingerite si trasformano in un ingombrante deposito di grasso all'interno della cellula, con conseguente aumento del peso corporeo. In questo studio i ricercatori hanno evidenziato che un difetto nella produzione di ossido nitrico, un messaggero cellulare che normalmente provvede a rifornire di ossigeno tutte le cellule dell'organismo, provoca una diminuzione nel numero dei mitocondri con una conseguente diminuzione dell'energia prodotta. Questo vuol dire che, a parità di cibo ingerito, l'aumento di peso è dovuto alla scarsa dispersione energetica. Inoltre si è osservato che le cavie che non producono ossido nitrico non solo ingrassano più delle altre, ma sono anche affette da ipertensione, diabete e iperlipemia, presentando quindi un quadro simile a quello della sindrome metabolica.

Come intervenire

La scoperta che l'ossido nitrico ha una funzione fondamentale nella produzione dei mitocondri potrebbe aprire la strada ad una nuova cura farmacologica per l'obesità. Ma i tempi sono lunghi e il problema obesità avanza con una velocità che non consente esitazioni sulla ricerca di un rimedio.

L'obesità comporta un aggravio enorme per il Servizio Sanitario Nazionale, stimabile in circa 22,8 miliardi di euro all'anno, di cui il 64% riferibile a ricoveri ospedalieri, poiché le persone con problemi legati al peso hanno spesso gravi malattie cardiovascolari. È dunque necessaria una maggiore prevenzione indirizzata alle persone a rischio.

All'inizio del 2003 il Ministro della Salute ha costituito una commissione di esperti anti-obesità con lo scopo di fornire indicazioni sulla dieta quotidiana per cercare di porre rimedio ai danni provocati da cattive abitudini alimentari ed errati stili di vita. La commissione ha anche il compito di sensibilizzare medici e pazienti sui rischi associati all'aumento di peso, promuovendo ad esempio la comunicazione tra centri anti-diabete e strutture multifunzionali in modo che l'obesità e la sindrome metabolica vengano considerate le diverse facce di uno stesso problema, da curare nella sua interezza e non "a pezzi".

Sempre a questo scopo è nato il progetto CARTESIO (CAlcolo del Rischio cardiovascolare TESt sull'Impatto dell'Obesità), con il patrocinio del Centro di Studio e Ricerca sull'Obesità dell' Università degli Studi di Milano e del Ministero della Salute. CARTESIO è uno strumento informatico per il medico, che aiuta nella valutazione del rischio cardiovascolare globale e di come questo si modifichi in relazione alla terapia adottata. Questo strumento stima la probabilità, per un individuo, di manifestare un evento cardiovascolare nell'arco di dieci anni, attraverso l'inserimento di pochi e semplici parametri: età, sesso, pressione, colesterolo, indice di massa corporea, fumo e diabete. Permette, quindi, di calcolare come, modificando uno o più parametri, il rischio globale si riduca, valutando quantitativamente l'efficacia degli interventi terapeutici. Il modello CARTESIO è stato ottenuto sulla base dei risultati di un importante studio prospettico di popolazione (3) condotto su 4400 soggetti ai quali sono state rilevate le caratteristiche di rischio negli anni 1960-1964 e che poi sono stati seguiti per 28 anni o fino al raggiungimento di 85 anni di età.

Il compito del medico potrebbe, in questo modo, essere facilitato poiché il paziente ha una chiara percezione del beneficio che può ricavare dalla prevenzione, e dovrebbe così essere più motivato ad accettare la terapia, anche se questa comporta aspetti difficili da modificare, come quelli legati allo stile di vita.

In conclusione l'obesità ha radici nel modo di pensare dell'individuo ed è questo che va modificato agendo sullo stile di vita dell'intera popolazione. Nel prossimo futuro sarà necessario avvalersi di campagne informative mirate, in modo da agire in maniera decisa sulle abitudini di vita degli italiani, soprattutto dei più giovani, perché capiscano che un'alimentazione corretta e un po' di movimento ogni giorno possono essere un primo investimento per una buona salute nel futuro.

Bibliografia

1. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Increased body weight was associated with increased death rates for all cancers combined and for cancers at multiple specific sites. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38.
2. Maggio CA, Pi-Sunyer FX. The prevention and treatment of obesity. Application to type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1997;20:1744-66.

3. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67(5):968-77.
4. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 2001;286(10):1195-200.
5. Istituto Auxologico Italiano. *4° Rapporto italiano sull'obesità*. Milano: Istituto Auxologico Italiano; 2002.
6. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348(26):2599-608.
7. Robinson TN. Reducing children's television viewing to prevent obesity: a randomized controlled trial *JAMA*. 1999; 282(16):1561-7.
8. Stunkard AJ. Current views on obesity. *Am J Med* 1996100(2):230-6.
9. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003;299(5608):896-9.

BASI NUTRIZIONALI DELL'OBESITÀ IN ETÀ PEDIATRICA

Marcello Giovannini, Silvia Scaglioni
Clinica Pediatrica, Ospedale S. Paolo, Università di Milano, Milano

Negli ultimi anni gli sforzi della ricerca sono stati indirizzati all'identificazione delle fasi critiche e dei fattori di rischio precoci dell'obesità e delle malattie cronico-degenerative. In tali studi è stata ribadita l'importanza del fattore genetico e dell'attività fisica, mentre è tuttora controverso il ruolo di energia e macronutrienti introdotti con la dieta.

L'attività fisica, componente chiave del bilancio energetico, dovrebbe essere sempre considerata in un discorso nutrizionale e incoraggiata a tutte le età, per favorire l'impostazione di una vita attiva. La spesa energetica destinata all'attività fisica infatti è l'unica che può essere modificata volontariamente.

Le fasi critiche individuate da Dietz (1) per lo sviluppo dell'obesità essenziale sono: *periodo prenatale, adiposity rebound e adolescenza*. A questi particolari periodi della vita, durante i quali il fattore nutrizionale è in grado di determinare un aumento significativo del rischio di sviluppo di obesità, possiamo aggiungere anche quello dell'*allattamento*.

A conferma dell'importanza del periodo prenatale vi sono numerosi studi che evidenziano la correlazione tra diabete gravidico, malnutrizione nel corso della gravidanza, peso alla nascita e sviluppo in età adulta di: obesità, malattia coronarica e patologie correlate, diabete e sindrome metabolica (2).

La carestia che colpì per 6 mesi l'Olanda nel corso della seconda guerra mondiale rappresenta un "esperimento naturale". Sulla base del periodo della gravidanza esposto alla malnutrizione sono stati creati 3 gruppi. Il gruppo che subì carestia nel terzo trimestre dimostrò avere una ridotta prevalenza di obesità all'età di 18 anni. Dato che nel terzo trimestre della vita fetale si verifica la replicazione degli adipociti e il rapido aumento del tessuto adiposo, i risultati ottenuti suggeriscono che una ridotta deposizione di massa grassa nella fase finale della gravidanza possa predisporre al mantenimento di un corretto rapporto tra peso e statura.

Al contrario una elevata prevalenza di obesità è stata osservata negli individui esposti alla carestia nei primi due trimestri di gravidanza. In tale periodo l'ipotalamo del feto inizia ad attivarsi e la disponibilità di substrati nel corso della gravidanza condiziona, attraverso un adattamento, la risposta dell'ipotalamo e del sistema nervoso simpatico all'*intake* calorico anche dopo la nascita. In caso di scarsa disponibilità di nutrienti nei primi 2 trimestri di gravidanza, l'ipotalamo dopo la nascita non sarebbe in grado di rispondere in modo adeguato alla condizione di apporto nutrizionale maggiore.

Numerose altre indagini hanno correlato sia il basso che l'elevato peso alla nascita con un più elevato rischio di sviluppare obesità.

Altri fattori di rischio sono rappresentati dal diabete materno e dal diabete gravidico, soprattutto se richiede trattamento con insulina. A questi si possono aggiungere altri potenziali meccanismi che coinvolgono la sintesi degli adipociti e la risposta del sistema nervoso centrale alla leptina.

Nel corso del primo anno di vita vi sono evidenze, anche se non univoche, che l'allattamento al seno per almeno 4 mesi rappresenti un fattore protettivo nei riguardi dell'obesità (3): la prevalenza di obesità in età adulta sarebbe significativamente inferiore nei bambini allattati con latte materno per un periodo di almeno 4 mesi.

Durante il divezzamento la prosecuzione del latte materno consente inoltre di fornire al lattante una quota adeguata di proteine. Nei primi 2 anni di vita una esagerata assunzione di proteine rappresenta l'errore nutrizionale più diffuso in numerosi Paesi Europei nei quali le rilevazioni nutrizionali dimostrano un *intake* di proteine compreso tra 3,3 e 4,4 g/kg.

Nell'indagine nutrizionale longitudinale, tuttora in corso, condotta dalla Clinica Pediatrica dell'Università di Milano presso l'Ospedale S.Paolo con lo scopo di approfondire i rapporti tra nutrizione nei primi anni di vita e sviluppo di sovrappeso in età scolare l'*intake* medio di proteine a 12 mesi è risultato pari a 4,5 g/kg a fronte di un apporto raccomandato di 1.87 g/kg.

Nello studio prospettico antropometrico e nutrizionale sono stati inclusi 147 bambini (67 femmine e 80 maschi) che sono stati sottoposti alla rilevazione di rischio familiare cardiovascolare, BMI dei genitori, modalità di allattamento e divezzamento, abitudini nutrizionali mediante Questionario delle Frequenze Alimentari e recall delle 24 ore all'età di 1 e 5 anni con follow-up che prevede controlli periodici nutrizionali e antropometrici fino all'età di 12 anni.

Tra i bambini allattati al seno (84%), la durata media dell'allattamento è risultata pari a 4.1 mesi. Non si è rilevata diversa prevalenza di sovrappeso (BMI > 90° percentile delle curve di BMI elaborate da Rolland-Cachera) tra maschi e femmine sia ad 1 anno (8,7% *vs* 13%, P=0,62) che a 5 anni.(20,0% *vs* 26,9%, P=0,32).

In accordo con la letteratura abbiamo rilevato una importante correlazione tra il sovrappeso dei bambini e quello dei genitori: il BMI dei bambini all'età di 5 anni correlava positivamente con il BMI ad 1 anno (r=0,46, P=< 0,0001) con il BMI del padre (r=0,35, P=< 0,0001) e con quello della madre (r=0,46, P=< 0,0001).

Per quanto riguarda l'assunzione di macronutrienti, i bambini che a 5 anni sono risultati sovrappeso, all'età di 1 anno avevano assunto con la dieta una quota di proteine significativamente più elevata di quelli non sovrappeso (*intake* di proteine 22% *vs* 20%, P=0,024) (4).

Il ruolo di un eccesso di proteine nella prima infanzia sullo sviluppo di obesità, è stato ipotizzato da Rolland-Cachera (5, 6) che aveva rilevato una significativa associazione tra elevato intake di proteine all'età di 2 anni sia con l'età di adiposity rebound che con lo sviluppo di obesità a 8 anni. L'ipotesi è che un precoce elevato apporto di proteine (7) possa influenzare i livelli di IGF-1 e indurre un aumento della differenziazione dei preadipociti in adipociti determinando l'iperplasia del tessuto adiposo.

La ricerca in campo nutrizionale ci suggerisce che la rilevazione dell'anamnesi generale (comprendente statura dei genitori ed eventuale presenza di disturbi del comportamento alimentare nei familiari), dell'anamnesi nutrizionale e della curva di accrescimento staturoponderale del bambino ci consente di individuare i soggetti ad elevato rischio di obesità (figli di genitori obesi e/o affetti da disordini del comportamento alimentare, figli di "madri nutrici", bambini che hanno assunto esagerata quota di proteine con la dieta nei primi anni di vita, bambini con *early adiposity rebound*) sui quali potranno essere adottate strategie preventive mirate e tempestive.

È opportuno ricordare che le raccomandazioni nutrizionali dovranno essere accompagnate da indicazioni anche di tipo comportamentale per evitare che i genitori possano utilizzare il cibo come ricompensa o soprattutto come nel caso della "madre nutrice" come risposta, specie nei primi anni di vita, al pianto che troppo spesso viene interpretato esclusivamente come espressione di fame e non come richiesta di attenzione (8, 9).

L'ultimo periodo critico per lo sviluppo dell'obesità è l'adolescenza. Nelle ragazze rappresenta una fase di aumentato rischio ma è anche il periodo della vita nel quale cambia la distribuzione del tessuto adiposo.

Vi sono studi che hanno valutato gli effetti dell'obesità durante l'adolescenza sulla morbilità e mortalità in età adulta (10). La mortalità da patologie coronariche, patologie cardiovascolari e cancro del colon e del retto risultava più elevata nei maschi che erano stati adolescenti obesi rispetto alle femmine e ai normopeso. Inoltre l'aggiustamento per il BMI in età adulta attenuava solo marginalmente tali rischi, suggerendo che la mortalità in età adulta fosse effetto dell'obesità presente in età adolescenziale.

Se andiamo ad osservare le abitudini in età adolescenziale ci accorgiamo che lo stile di vita è prevalentemente sedentario e che, a fronte di un apporto calorico in linea con i LARN che diventa eccessivo se correlato alla spesa energetica, l'*intake* di lipidi risulta notevolmente aumentato (38%) rispetto le raccomandazioni internazionali. A partire dai 2 anni infatti viene consigliata un progressiva riduzione dell'*intake* dal 30 al 25%. L'incremento di assunzione di lipidi non induce un aumento dell'ossidazione lipidica, che al contrario si riduce e determina un aumento importante dell'immagazzinamento dei grassi e conseguente incremento della massa grassa.

Ci sembra quindi importante che il pediatra, individuati i fattori nutrizionali e le fasce di età a rischio per lo sviluppo di obesità attui un intervento educativo e preventivo promuovendo l'allattamento materno protratto, fornendo successivamente precise indicazioni nutrizionali qualitative e quantitative, quindi controllando che l'apporto di proteine nei primi due anni di vita si mantengano entro i limiti di sicurezza. fino all'adolescenza e controllandone la corretta applicazione.

Il compito del medico è quello di indirizzare le abitudini di vita e nutrizionali del bambino, dell'adolescente e della sua famiglia con una vera e propria azione educativa. Il coinvolgimento e la motivazione di tutta la famiglia all'acquisizione di abitudini di vita caratterizzate da una vita attiva e dalla scelta di un'alimentazione varia e adeguata ai fabbisogni sono un obiettivo del pediatra.

Bibliografia

1. Dietz WH. Periods of risk in childhood for the development of adult obesity. What do we need to learn? *J Nutr* 1997;127:1884S-1886S.
2. Barker DJP. Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child* 1999;80:305-310.
3. Arenz S, Rückerl R, Koletzko B, von Kries R. Breast-feeding and childhood obesity – a systematic review. *Int J Obes* 2004;28:1247-56.
4. Scaglioni S, Agostoni C, De Notaris R, Radaelli G, Radice N, Valenti M, Giovannini M, Riva E. Early macronutrient intake and overweight at five years of age. *Int J Obes* 2000;24:777-81.
5. Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Bellisle F. Increasing prevalence of obesity among 18-year-old males in Sweden: evidence for early determinants. *Acta Paediatr* 1999;88:365-7.
6. Rolland Cachera MF, Deheeger M, Akrout M, Bellisle F Influence of macronutrients on a adiposity development: a follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:573-8.
7. Skinner JD, Bounds W, Carruth BR, Morris M, Ziegler P. Predictors of chidren's body mass index: a longitudinal study of diet and growth in children aged 2-8 y. *Int J Obes* 2004;28:476-82.
8. Benton D Role of parents in the determination of the food preferences of children and the development of obesity. *Int J Obes* 2004;28:858-69.
9. Birch LL, Fisher JO, Davison KK. Learnig to overeat: maternal use of restrictive feeding practices promotes girl's eating in the absence of hunger. *Am J Clin Nutr* 2003;78:215-20.
10. Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 2002;360:473-482.

EFFETTI DELLA DIETA SULLA SENSIBILITÀ INSULINICA

Gabriele Riccardi (a), Michele Iaccarino (a), Lara Bruno (b), Rosalba Giacco (b)
(a) Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Facoltà di Medicina, Università "Federico II", Napoli
(b) Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino

Introduzione

La sensibilità insulinica è un fattore chiave per l'organismo in quanto ha un ruolo cruciale nello sviluppo di numerose alterazioni metaboliche che caratterizzano la sindrome metabolica. L'insulino-sensibilità rappresenta, infatti, l'interfaccia tra fattori genetici e ambientali che regolano una serie di funzioni coinvolte nel metabolismo intermedio, nel deposito di grasso corporeo e nella regolazione del sistema cardiovascolare. La relazione tra queste differenti funzioni è complessa e spesso non è possibile identificare l'esatta sequenza di eventi responsabili dello sviluppo di un'alterata sensibilità insulinica.

L'insulino-resistenza può essere indotta da differenti fattori ambientali, incluse le abitudini alimentari, infatti la dieta è in grado di influenzare la sensibilità insulinica sia attraverso il suo contenuto energetico che la sua composizione in acidi grassi e carboidrati.

Obesità e insulino-sensibilità

L'obesità, specialmente quando l'adiposità è localizzata a livello addominale, è un importante determinante dell'insulino-resistenza e rappresenta il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di sindrome metabolica e di malattie cardiovascolari. Diete ad alta densità energetica e ricche in grassi si associano al sovrappeso. Comunque, l'incremento ponderale nei soggetti con stile di vita sedentario dipende complessivamente dall'equilibrio tra *intake* e dispendio energetico; in alcuni casi, particolarmente nei bambini e adolescenti, anche un eccessivo consumo di alimenti ricchi in carboidrati ad alta densità energetica (bevande zuccherate) può essere predittivo di sovrappeso (1).

Il legame tra consumo di grassi e sovrappeso non è, però, limitato all'alto contenuto energetico dei cibi ricchi in grassi ma anche ad una ridotta capacità ad ossidare i grassi alimentari esogeni ed endogeni; infatti i soggetti predisposti all'obesità presentano una ridotta capacità ad ossidare grassi e quindi, in presenza di una dieta ipercalorica, l'eccesso di energia sotto forma di grasso viene accumulato nel tessuto adiposo con un'espansione delle riserve di grasso corporeo e l'aumento di peso (2).

L'importanza del sovrappeso in relazione al rischio di sindrome metabolica e dei fattori di rischio cardiovascolari è enfatizzato da studi d'intervento, i quali mostrano che una riduzione ponderale diminuisce l'incidenza del diabete e migliora tutte le alterazioni della sindrome metabolica. Infatti, negli individui obesi la perdita di peso migliora la sensibilità insulinica dei tessuti periferici con un miglioramento del metabolismo glucidico, lipidico e una riduzione della pressione arteriosa.

Grassi ed insulino-sensibilità

La relazione tra consumo di grassi totali della dieta e la sensibilità insulinica, indipendentemente dai suoi effetti sul peso corporeo, è stata valutata da studi d'intervento che hanno tentato di influenzare la sensibilità insulinica cambiando, in condizioni isoenergetiche, la quantità totale dei nutrienti, in particolare la quantità dei carboidrati e grassi totali.

I pochi studi ben controllati disponibili in letteratura, che hanno misurato la sensibilità insulinica mediante metodi sensibili, suggeriscono che quando l'apporto di grassi totali varia tra il 20 e 40% delle calorie totali non c'è nessun effetto sulla sensibilità insulinica, quando esso supera il 40% la sensibilità insulinica peggiora (3).

Per quanto riguarda gli effetti della composizione in acidi grassi della dieta sulla sensibilità insulinica c'è una considerevole evidenza in studi su animali che i grassi saturi peggiorano, mentre gli acidi grassi ω-3 migliorano l'azione insulinica e i monoinsaturi e gli ω-6 hanno meno effetti negativi sulla sensibilità insulinica rispetto ai saturi; questi dati non sono stati però confermati in studi sull'uomo.

Nell'uomo, i risultati degli studi epidemiologici mostrano un'associazione positiva tra consumo di grassi saturi e peggioramento dell'insulino-sensibilità mentre il contrario è dimostrato per gli acidi grassi insaturi. La maggior parte degli studi d'intervento non hanno però dimostrato che la modifica della qualità dei grassi influenza l'insulino-sensibilità, probabilmente per la scarsa numerosità del campione e per la breve durata dello studio. Tale dimostrazione, tuttavia, si è ottenuta recentemente grazie al KANWU Study, uno studio di intervento che ha valutato l'effetto dei grassi della dieta sull'insulino-sensibilità usando metodologie adeguate e un campione di grandezza sufficiente (4). Questo studio è stato condotto su 162 soggetti sani reclutati in 5 Paesi, che erano assegnati in modo casuale ad una dieta ricca in grassi saturi o ricca in grassi monoinsaturi, entrambe simili per tutti gli altri costituenti. I risultati di questo studio dimostrano che i grassi saturi peggiorano l'insulino-sensibilità (-10%, p=0,03) mentre quelli monoinsaturi non la influenzano (Tabella 1).

Tabella 1. Effetti di diete con diversa composizione sull'insulino-resistenza

Dieta	Insulino-resistenza
Ricca in carboidrati	↑
Ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico	↓
Ricca in grassi saturi	↑
Ricca in grassi monoinsaturi	↓ o =
Ricca in grassi polinsaturi ω-3	=
Ricca in grassi polinsaturi ω-6	↓ (?)

I risultati di questo studio dimostrano anche che, quando l'introito di grassi totali della dieta è alto (>37% delle calorie totali), l'effetto della qualità dei grassi sull'insulino-sensibilità scompare mentre nel gruppo che consuma una quantità moderata di grassi (<37% delle calorie totali) l'effetto del tipo di grasso utilizzato sulla sensibilità insulinica viene amplificato, infatti la differenza tra le due diete è ancora più netta (20,3%, p<0,03).

Per quanto riguarda l'influenza degli acidi grassi ω-3 sull'insulino-sensibilità nell'uomo, la maggior parte degli studi d'intervento, con un disegno di studio ben controllato, sono stati eseguiti su diabetici tipo 2. In tutti questi studi la supplementazione con acidi grassi ω-3 a lunga catena non ha indotto nessun cambiamento della sensibilità insulinica neppure quando la durata

dello studio è stata sufficientemente lunga da indurre una modifica della composizione delle membrane cellulari (5). Questo risultato è confermato nella popolazione sana dal già menzionato studio KANWU in cui la supplementazione di acidi grassi ω-3 a lunga catena non influenza la sensibilità insulinica sia nel gruppo assegnato alla dieta ricca in insaturi o in quello assegnato alla dieta ricca in monoinsaturi.

I meccanismi attraverso cui la qualità dei grassi alimentari influenza l'insulino-sensibilità sono mediati, almeno in parte, dalla composizione degli acidi grassi delle membrane cellulari. Uno specifico profilo degli acidi grassi nelle membrane cellulari può infatti influenzare l'azione insulinica alterando il legame o l'affinità del recettore per l'insulina, la permeabilità ionica e i segnali cellulari.

Carboidrati e insulino-sensibilità

Per quanto riguarda l'effetto dei carboidrati della dieta sull'insulino-sensibilità, gli studi della letteratura che hanno confrontato l'effetto di un elevato apporto di carboidrati, inferiore però al 60% delle calorie giornaliere, rispetto ad una dieta ricca in monoinsaturi, hanno dimostrato che la dieta ad alto contenuto in CHO non solo peggiora la sensibilità insulinica ma induce anche un aumento della glicemia postprandiale, dei trigliceridi plasmatici a digiuno e nel periodo postprandiale e una diminuzione dei livelli delle HDL (6). Tuttavia, se la dieta ricca in carboidrati è composta da alimenti particolarmente ricchi in fibre vegetali solubili (legumi, ortaggi e frutta) piuttosto che da alimenti amidacei (pane, pasta e patate), gli effetti metabolici sono diversi (Tabella 1).

Un nostro studio ha confrontato gli effetti di una dieta ad alto contenuto in carboidrati e fibre (con il 60% di CHO e circa 40 g di fibre prevalentemente idrosolubili) con quelli di una dieta ad alto contenuto in grassi monoinsaturi in pazienti diabetici tipo 2. La dieta ricca in fibre ha portato ad un miglioramento della glicemia postprandiale, mentre non ci sono state variazioni della sensibilità insulinica (7). Sebbene i pochi studi di intervento presenti in letteratura non abbiano dimostrato un miglioramento della sensibilità insulinica in soggetti trattati con diete ricche in fibre solubili e a basso indice glicemico (IG), tuttavia un grande numero di studi prospettici riporta effetti benefici sui fattori di rischio associati all'insulino-resistenza e allo sviluppo di diabete tipo 2 negli individui che consumano più fibre e alimenti a basso indice glicemico. Un recente studio, condotto nei figli dei partecipanti allo studio di Framingham, ha dimostrato che l'*intake* di fibre è inversamente associato, e l'indice glicemico e il glycemic load positivamente associato, con l'HOMA-IR, indice di insulino-resistenza (8).

In conclusione, la composizione della dieta influenza l'insulino-resistenza e le patologie ad essa correlate. Sono però necessari altri studi controllati e a lungo termine per confermare gli effetti dei carboidrati e dei grassi sulla sensibilità insulinica. Allo stato attuale l'incremento di CHO in assenza di un parallelo incremento del consumo di fibre in sostituzione dei saturi non è consigliabile, soprattutto ai soggetti con anomalie del metabolismo glucidico, lipidico e insulino-resistenza. Un'alternativa all'aumento dei soli carboidrati è rappresentato dall'aumento nella dieta di alimenti ricchi in fibre solubili e di alimenti a basso indice glicemico che sono in grado di migliorare il metabolismo glico-lipidico. I grassi monoinsaturi non hanno effetti negativi sul metabolismo glico-lipidico e sull'insulino-resistenza e quindi possono essere utilizzati in sostituzione dei CHO quando la dieta ricca in CHO e fibre non è attuabile.

Bibliografia

1. Ludwig DS, Peterson KE, Gortmaker SL. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* 2001; 357:505-8.
2. Giacco R, Clemente G, Busiello L, Lasorella G, Rivieccio AM, Rivellese AA, Riccardi G. Insulin sensitivity is increased and fat oxidation after a high-fat meal is reduced in normal-weight healthy men with strong familial predisposition to overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:342-8.
3. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004; 23: 447-56.
4. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen Kea. Substituting dietary saturated fat for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women. *Diabetologia* 2001; 44:312-9.
5. Rivellese AA, Maffettone A, Iovine C, Di Marino L, Annuzzi G, Mancini M. Long term effects of fish oil on insulin resistance and plasma lipoproteins in NIDDM patients with hypertriglyceridemia. *Diabetes Care* 1996; 19:1207-13.
6. Parillo M, Rivellese AA, Ciardullo AV, Capaldo B, Giacco A, Riccardi G. A high monounsaturated-fat diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1992; 41: 1371-8.
7. Riccardi G, Rivellese A. Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care* 1991; 14: 1115-25.
8. McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzaman E, Wilson PW, Jacques PF. Carbohydarte nutrition, insulin resistance, and prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* 2004; 27:613-24.

EFFETTO DI COMUNI POLIMORFISMI IN GENI CANDIDATI SULLA PERDITA DI PESO IN SOGGETTI MORBIDAMENTE OBESI SOTTOPOSTI A BENDAGGIO GASTRICO

Giorgio Sesti
Cattedra di Medicina Interna, Università "Magna Græcia", Catanzaro

Introduzione

Nel corso dell'ultimo decennio, abbiamo assistito ad un allarmante aumento del fenomeno dell'obesità sia negli adulti che nei bambini a livello mondiale (1). L'obesità è associata ad un aumentato rischio per numerose patologie quali il diabete mellito di tipo 2, patologie cardiovascolari, dislipidemie e cancro (1). L'aumento di peso è la conseguenza di uno squilibrio cronico tra apporto energetico e dispendio energetico; quest'ultimo è influenzato da vari fattori, alcuni dei quali determinati a livello genetico. La perdità di peso è in grado di prevenire lo sviluppo di numerose patologie correlate all'obesità o di diminuirne la gravità nel caso che esse siano già presenti.

Sfortunatamente il trattamento dell'obesità tramite regimi dietetici risulta spesso inefficace e anche i pochi farmaci che vengono utilizzati per trattare questa patologia inducono una perdita di peso non superiore al 5-10% del peso corporeo con un'elevatissima percentuale di recidive.

Il bendaggio gastrico per via laparoscopica (LAGB) è stato proposto come un possibile approcio terapeutico per ottenere una duratura perdita di peso in pazienti con obesità di terzo grado, secondo la classificazione dell' Organizzazione Mondiale della Sanità (2).

Metodi

Il LAGB è una procedura chirurgica, moderatamente invasiva; consiste nel posizionamento di un anello di silicone attorno allo stomaco, che causa una drastica riduzione del volume dello stesso e induce quindi un aumento della sensazione di sazietà. Tale procedura è regolarmente eseguita in un ristretto numero di Centri in Europa ed è stata recentemente approvata dalla Food and Drug Administration negli Stati Uniti.

I 167 pazienti utilizzati nello studio i cui risultati sono qui riportati sono stati sottoposti a LAGB presso l'Ospedale San Raffaele di Milano (3). Studi preliminari hanno dimostrato che il LAGB è un trattamento efficace con il quale si ottiene una significativa e duratura perdita di peso nei pazienti obesi. Tuttavia, in una significativa percentuale di pazienti, si osserva solamente una modesta perdita di peso, seguita dalla tendenza a riguadagnare il peso perduto (3).

È possibile ipotizzare che alcuni dei fattori genetici che determinano la predisposizione all'obesità abbiano un ruolo anche nell'influenzare la risposta al LAGB. Per valutare tale ipotesi abbiamo individuato quattro geni, che avessero un ruolo chiave nella regolazione genetica del peso corporeo.

Geni candidati

Il primo di tali geni è PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ). PPARγ è un fattore di trascrizione coinvolto nel metabolismo lipidico e glicidico, oltre che nel trasporto di acidi grassi e nel differenziamento delle cellule adipose.

Un comune polimorfismo nel gene di PPARγ, consistente nella sostituzione di una Prolina con un'Alanina in posizione 12 (Pro12Ala) è stato associato con un ridotto rischio di sviluppare diabete di tipo 2. Numerosi studi hanno anche valutato se il polimorfismo fosse associato con l'indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI) od altri indici di obesità; una recente metanalisi su un totale di 19.136 soggetti ha dimostrato che il polimorfismo Pro12Ala è effettivamente associato con un aumento del peso corporeo (4). Inoltre, uno studio prospettico ha rivelato come tale polimorfismo sia associato anche ad una tendenza a riguadagnare il peso perduto dopo trattamento dietetico (5, 6).

Un comune polimorfismo nel gene per IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1), consistente nella sostituzione di una Glicina con un'arginina in posizione 972 (Gly972Arg), è associato con diabete di tipo 2 e insulino-resistenza (7) e appare anche interagire con l'obesità, aumentando l'insulino-resistenza ad essa correlata (8, 9).

UCP2 (Uncoupling protein 2) è un membro della famiglia di trasportatori protonici localizzati sulla membrana mitocondriale ed è espresso in vari tessuti, tra cui il tessuto adiposo, il tessuto muscolare, il fegato e le beta-cellule pancreatiche (10). È stato dimostrato che il polimorfismo G-866A nel promotore del gene di UCP2, che ne aumenta l'attività trascrizionale, è associato ad un ridotto rischio di sviluppare obesità (11).

La citochina IL-6 (interleukine-6) è secreta in quantità significative dal tessuto adiposo sottocutaneo e le sue concentrazioni sieriche sono correlate con gli indici di obesità (12, 13). Un comune polimorfismo G-174C nel promotore del gene per IL-6 ne regola l'attività, con l'allele G associato ad aumentata attivitaà trascrizionale, sia in condizioni basali che in risposta ad uno stimolo infiammatorio (14). È stato suggerito che l'allele G sia più comune in soggetti magri (15), e che soggetti con genotipo G-174G o G-174C abbiano un dispendio energetico significativamente maggiore dei soggetti C-174C, risultando protetti dall'incremento di peso (16).

Risultati

In questo studio, non sono state riscontrate differenze significative nelle caratteristiche cliniche (riassunte nella Tabella 1) tra i diversi genotipi nei soggetti analizzati.

La perdita di peso, valutata sei mesi dopo l'intervento, riportata come $((BMI_{6\text{-mesi follow-up}} - BMI_{basale})/BMI_{basale}) \times 100$ risultava invece significativamente aumentata nei portatori del genotipo G-174G del promotore di IL-6 sia rispetto agli eterozigoti G-174C che agli omozigoti C-174C e si osservava una riduzione di peso significativamente maggiore anche nei soggetti omozigoti per A-866A nel promotore di UCP-2 rispetto sia agli eterozigoti G-866A che agli omozigoti G-866G (Tabella 2).

Una tendenza ad una maggiore perdita di peso era presente anche nei soggetti portatori del genotipo Gly972Gly nel gene di IRS-1, anche se tale differenza non raggiungeva la significatività (Tabella 2). Non si osservava invece nessuna differenza tra i portatori dei diversi genotipi del gene per PPARγ, anche se occorre tener conto del fatto che nessun portatore del genotipo Ala12Ala è stato riscontrato in questo studio e non è quindi possibile escludere che questo potrebbe avere un effetto sulla perdita di peso (Tabella 2).

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio

Variabile	Valori
Maschi/femmine (n.)	24/143
Età (anni)	40±10
BMI (kg/m^2)	44,6±6,5
Rapporto vita/fianchi	0,88±0,07
Vita (cm)	122±14
Glicemia a digiuno(mg/dL)	110±39
Glicemia a 2-h (mg/dL)	155±77
HbA1c (%) (emoglobina glicosilata)	6,0±1,2
Insulina a digiuno (μU/mL)	19±12
Colesterolo totale (mg/dL)	204±41
HDL (mg/dL)	47±12
Trigliceridi (mg/dL)	155±101
HOMA (*Homeostasis Model Assessment*)	5,2±4,2

Tabella 2. Variazione del BMI sei mesi dopo LABG nei diversi genotipi

Polimorfismi	BMI Iniziale	Variazione del BMI (%)
Pro12Pro (n.=141)	44,3±6,2	-15,9±6,9
Pro12Ala (n.=23)	46,5±8,3	-16,4±7,1
Gly972Gly (n.=152)	44,6±7,0	-16,4±7,0
Gly972Arg (n.=15)	44,5±4,9	-12,9±4,9
G-174G (n.=76)	44,0±5,3	-17,5±7,1*
G-174C (n.=77)	45,3±7,4	-15,5±6,5
C-174C (n.=13)	44,6±7,4	-12,4±6,5
G-866G (n.=85)	45,5±6,7	-15,3±7,1§
G-866A (n.=66)	43,9±5,9	-15,7±6,0†
A-866A (n.=13)	41,9±7,5	-20,1±6,0

I dati sono espressi come media ± DS **P* =0,019 *vs* C-174C, §*P*=0,018 *vs* A-866A, e †*P*=0,035 *vs* A-866A

Il fatto che i portatori del genotipo A-866A di UCP2 perdano più peso può essere spiegato in base ad un aumentato dispendio energetico dovuto ad aumentati livelli di espressione della proteina UCP2 (11).

Diversi sono invece i meccanismi molecolari che possono giustificare l'aumentato decremento di peso nei soggetti portatori del polimorfismo C-174G di IL-6. IL-6 è infatti in grado di indurre un aumento del dispendio energetico agendo sia a livello centrale sull'ipotalamo (17) sia a livello periferico, aumentando la stimolazione adrenergica (18). È inoltre possibile che IL-6 agisca modulando la funzione delle aromatasi, enzimi chiave nel metabolismo degli estrogeni, che influenza la sensazione di sazietà e la distribuzione corporea del tessuto adiposo (19).

Per quel che riguarda IRS-1 il fatto che non si osservino differenze statisticamente significative tra i portatori delle varianti del gene potrebbe essere dovuto al campione relativamente piccolo. È interessante osservare che il polimorfismo Gly972Arg potrebbe esercitare il suo effetto sul peso corporeo influenzando i livelli di leptina. È stato, infatti, dimostrato che portatori obesi della variante Gly972Arg hanno concentrazioni di leptina significativamente più basse di soggetti obesi che presentano il genotipo Gly972Gly (20).

In conclusione questo studio dimostra un' influenza genetica sulla perdita di peso e pone le basi per successivi studi sull'efficacia di interventi terapeutici volti a ridurre l'obesità.

Bibliografia

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-43.
2. Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. *WHO Tech Rep Ser* 1995;854:1-452.
3. Pontiroli EA, Pizzocri P, Librenti MC, Vedani P, Marchi M, Cucchi E, Orena C, Paganelli M, Giacomelli M, Ferla G, Folli F. Laparoscopic adjustable gastric banding for the treatment of morbid (grade 3) obesity and its metabolic complications: a three-year study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 87:3555-61.
4. Masud S, Ye S**.** Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet* 2003;40:773-80.
5. Ek J, Urhammer SA, Sørensen TIA, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-γ2 (PPAR-γ2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999;42:892-5.
6. Nicklas BJ, van Rossum EFC, Berman DM, Ryan AS, Dennis KE, Shuldiner AR. Genetic variation in the peroxisome proliferator-activated receptor-γ 2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain. *Diabetes* 2001;50: 2172-6.
7. Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O Amino acid polymorphism of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993;342:828-32.
8. Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, Hansen L, Almind K, Winther K Insulin resistance: interaction between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 1995;346;397-402.
9. Baroni MG, Arca M. Sentinelli F, Buzzetti R, Capici F, Lovari S, Vitale M, Romeo S, Di Mario U. The G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene, body fat distribution and insulin-resistance. *Diabetologia* 2001;44:367-72.
10. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH: Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997;15:269-72.
11. Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, Ebenbichler C, Paulweber B, Sandhofer F, Ladurner G, Hell E, Strosberg AD, Patsch JR, Krempler F, Patsch W: A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat Genet* 2001;28:178-83.
12. Fried SK, 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.
13. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001;9:414-7.
14. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P 1998 The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-76
15. Berthier M-T, Paradis A-M, Tchernof A, Bergeron J, Prud'homme D, Després J-P, Vohl M-C. The interleukin 6 -174G/C Polymorphism is associated with indices of obesity in men. *J Hum Genet* 2003;48:14-9.
16. Kubaszek A, Pihlajamaki J, Punnonen K, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. *Diabetes* 2003;52:558-61.

17. Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP. Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* 1997;66:54-62.

18. Marz P, Cheng JG, Gadient RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U, Rose-John S: Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3251-6.

19. Purohit A, Ghilchik MW, Duncan L, Wang DY, Singh A, Walker MM, Reed MJ. Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3052-8.

20. Krempler F, Hell E, Winkler C, Breban D, Patsch W. Plasma Leptin Levels Interaction of Obesity With a Common Variant of Insulin Receptor Substrate-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1686-90.

TESSUTO ADIPOSO, INSULINO-RESISTENZA E LIPEMIA POSTPRANDIALE IN SOGGETTI OBESI CON E SENZA DIABETE

Giovanni Annuzzi (a), Rosalba Giacco (b), Lidia Patti (a), Lucrezia Di Marino (a), Claudia De Natale (a), Valentina Minerva (a), Roberta Masella (c), Carmela Santangelo (c), Gabriele Riccardi (a), Angela A. Rivellese (a)
(a) Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi Federico II, Napoli
(b) Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino
(c) Centro per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Studio trasversale

Razionale

Alterazioni postprandiali delle lipoproteine plasmatiche sono associate ad un aumentato rischio cardiovascolare (1). Le persone con insulino-resistenza, i pazienti obesi e i diabetici tipo 2, presentano alterazioni lipidiche postprandiali, che potrebbero spiegare il loro aumentato rischio cardiovascolare. Non è chiaro se queste anomalie postprandiali sono presenti anche con normali livelli plasmatici di trigliceridi a digiuno, e se c'è una relazione diretta con il livello di insulino-resistenza, che è un fattore indipendentemente legato allo sviluppo della dislipidemia postprandiale (2).

Un possibile meccanismo attraverso il quale l'insulino-resistenza altera il metabolismo lipidico nel periodo postprandiale può essere una ridotta attività della lipasi lipoproteica (*LipoProtein Lipase*, LPL). Tuttavia, in studi precedenti condotti dal nostro gruppo l'attività plasmatica totale della LPL non era ridotta nei pazienti con diabete tipo 2 che presentavano alterazioni lipoproteiche postprandiali (2, 3). Un ruolo rilevante nella patogenesi di queste alterazioni potrebbe essere svolto dal tessuto adiposo, che potrebbe agire da *buffer* nei confronti dei grassi alimentari, regolando l'afflusso dei trigliceridi circolanti e minimizzando l'esposizione dei vari tessuti ai livelli eccessivi di trigliceridi (4).

Per chiarire tali problematiche abbiamo, pertanto, valutato la lipemia postprandiale di individui obesi con e senza diabete e di controlli normopeso, dando particolare rilievo allo studio del ruolo della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo e dell'espressione genica nel tessuto adiposo di ormoni/enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico a digiuno e postprandiale.

Metodi

Soggetti. Sono stati studiati 10 soggetti obesi affetti da diabete mellito tipo 2 in terapia dietetica, 9 soggetti obesi non diabetici e 8 soggetti sani normopeso, tutti di sesso maschile, di età compresa tra 40 e 60 anni, con normali livelli plasmatici a digiuno di trigliceridi e colesterolo. L'indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI) dei soggetti obesi era compreso tra 30 e 35 kg/m^2.

Disegno dello studio. A digiuno, al mattino, i soggetti hanno consumato un pasto test ricco in grassi, costituito da un gateau di patate, del contenuto calorico di 944 kcal, rappresentate per il 57% da grassi, il 31% da carboidrati e il 12% da proteine. Prima del pasto e nelle sei ore

successive sono stati effettuati prelievi ematici seriali per la determinazione nel plasma di colesterolo, trigliceridi, lipoproteine – chilomicroni, VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) grandi, VLDL piccole, IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*), HDL (*High Density Lipoprotein*), acidi grassi liberi, glucosio e insulina.Sei ore dopo il pasto è stata effettuata un'agobiopsia del tessuto adiposo sottocutaneo nei quadranti inferiori addominali per la misurazione dell'attività della LPL nel tessuto adiposo e la determinazione dell'espressione genica di fattori tissutali – LPL, HSL (*Hormone Sensitive Lipase*), adiponectina, leptina, PPARγ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) – potenzialmente coinvolti nel metabolismo lipidico. In un altro giorno, con le stesse modalità e per le medesime valutazioni, è stata effettuata un'agobiopsia del tessuto adiposo a digiuno e, successivamente, un clamp euglicemico iperinsulinemico (1,5 mU insulina /kg p.c./min) per la valutazione della sensibilità insulinica.

In tutti i partecipanti sono state determinate la composizione corporea (impedenzometria), la distribuzione del grasso corporeo (misurazione circonferenze) e la dieta abituale (diario alimentare). Le lipoproteine plasmatiche sono state studiate mediante ultracentrifugazione preparativa a gradiente di densità discontinuo (5).

Statistica

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. La risposta postprandiale è valutata come area incrementale sotto la curva *(Incremental Area Under Curve*, IAUC), calcolata con il metodo trapezoidale. Per i confronti tra i 3 gruppi è stata utilizzata l'ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) e, successivamente, il t-test per dati non appaiati.

Risultati

La sensibilità insulinica valutata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico era similmente ridotta negli obesi con diabete (4,5±1,4 mg/kg p.c./min) e senza diabete (4,0±1,5) rispetto ai controlli (7,7±1,9). La risposta insulinemica postprandiale era aumentata nei pazienti obesi, con e senza diabete, rispetto ai controlli normopeso, con una tendenza ad una risposta precoce più accentuata negli obesi non diabetici (Figura 1).

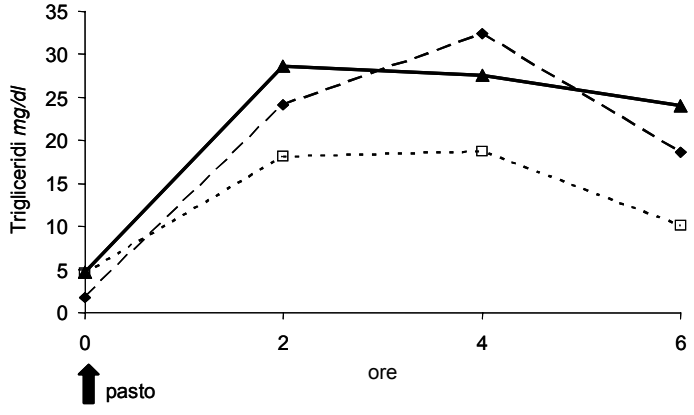

Figura 1. Risposta dei trigliceridi dei chilomicroni ad un pasto ricco in grassi in individui obesi con diabete (◆- - - -◆), obesi senza diabete (▲——▲) e controlli normopeso (□·····□)

L'aumento postprandiale dei lipidi dei chilomicroni era maggiore nei pazienti diabetici rispetto ai soli obesi, mentre la risposta nei soggetti di controllo era simile a quella dei diabetici.

L'aumento postprandiale delle VLDL era significativamente maggiore nei due gruppi di obesi rispetto ai normopeso (Figura 2). L'attività della LPL nel tessuto adiposo era ridotta nei pazienti diabetici rispetto agli altri due gruppi.

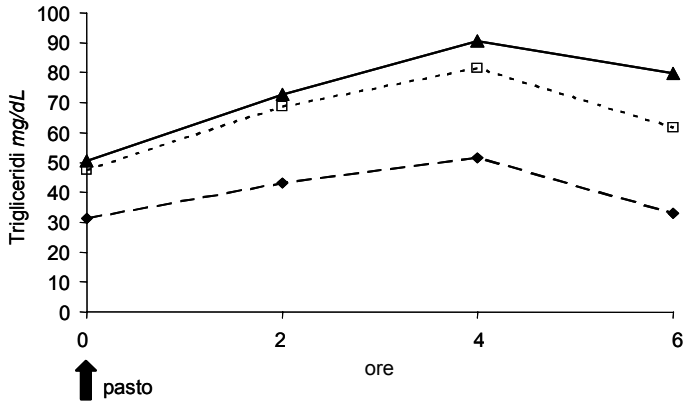

Figura 2. Risposta dei trigliceridi delle VLDL grandi ad un pasto ricco in grassi in individui obesi con diabete (◆- - - -◆), obesi senza diabete (▲——▲) e controlli normopeso (□·····□)

Conclusioni

I soggetti obesi con diabete e quelli senza diabete, con livelli comparabili di insulino-resistenza, presentano simili alterazioni postprandiali delle VLDL più grandi, che rappresentano, quindi, delle alterazioni prevalentemente legate all'insulino-resistenza.

Tuttavia, il diabete di per sé, rispetto alla sola obesità, è caratterizzato da un aumento della risposta postprandiale dei chilomicroni. Questa alterata risposta potrebbe essere legata alla ridotta attività della LPL del tessuto adiposo osservata nei soggetti obesi con diabete rispetto a quelli solo obesi.

Studio di intervento dietetico

Razionale

Negli scorsi anni è stato molto enfatizzato il ruolo della quantità dei grassi della dieta come fattore in grado di influenzare l'insulino-resistenza, mentre poca importanza è stata data al possibile effetto della qualità dei grassi sull'insulino-sensibilità e sulla lipemia postprandiale (6).

Sono pochi gli studi che hanno confrontato gli effetti di una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi rispetto ad una ricca in grassi saturi sulla lipemia postprandiale. I risultati di questi studi, spesso contrastanti, non sembrano indicare un effetto sulla lipemia postprandiale significativamente diverso tra i due tipi di grassi. Recentemente lo studio KANWU ha

dimostrato che la sostituzione parziale degli acidi grassi saturi con quelli monoinsaturi nell'ambito di una dieta ricca in grassi (37% dell'energia totale) migliora la sensibilità insulinica in individui sani (7). Non sappiamo però se questo effetto si ottiene anche in soggetti con marcata insulino-resistenza quali appunto individui obesi o pazienti obesi affetti da diabete tipo 2 e se questa variazione qualitativa della dieta è in grado di modificare la lipemia postprandiale. In particolare sono completamente sconosciuti i fattori molecolari attraverso i quali la qualità degli acidi grassi della dieta possa influenzare la lipemia postprandiale.

Pertanto, in uno studio di intervento dietetico abbiamo valutato gli effetti di una diversa composizione dei grassi della dieta (monoinsaturi vs saturi) su insulino-resistenza, lipemia postprandiale e fattori ormonali/enzimatici nel tessuto adiposo.

Metodi

Sei soggetti maschi affetti da diabete mellito tipo 2, di età 53±8 anni e BMI 30,2±1,6 kg/m^2, sono stati sottoposti con disegno cross-over randomizzato per 3 settimane ad una dieta ricca in grassi saturi (*SAtured Fatty Acids*, SAFA) e per 3 settimane a una dieta ricca in grassi monoinsaturi (*MonoUnsatured Fatty Acids*, MUFA). Le diete erano isoenergetiche e simili per contenuto in macronutrienti (carboidrati 49%, grassi 35% e proteine 16%), ma differenti per il tipo di acidi grassi. Infatti una dieta era ricca in SAFA (17% SAFA, 3% polinsaturi e 15% MUFA) e l'altra in MUFA (8% SAFA, 4% polinsaturi e 23% MUFA).

Per aumentare l'adesione alla dieta, i pasti sono stati forniti già preparati ai partecipanti per tutta la durata dello studio.

Alla fine dei due periodi di dieta è stata effettuata la valutazione della lipemia postprandiale, dell'attività della LPL del tessuto adiposo e della sensibilità insulinica come nello studio trasversale.

Statistica

I risultati ottenuti alla fine dei due periodi di dieta sono stati confrontati con il t-test per dati appaiati.

Risultati

Alla fine dei due periodi di trattamento non si sono osservate differenze nei parametri antropometrici, così come nel livello di sensibilità insulinica. La velocità di infusione di glucosio durante *clamp* euglicemico iperinsulinemico era infatti simile con la dieta MUFA (3,8±1,2 mg/kg p.c./min) e la dieta SAFA (4,5±1,8 mg/kg p.c./min).

Per quanto riguarda la risposta al pasto non si sono osservate differenze nella risposta plasmatica di glucosio, insulina e FFA (*Free Fatty Acids*). I livelli di trigliceridi e colesterolo nei chilomicroni tendevano ad essere più alti nella fase tardiva postprandiale con la dieta ricca in SAFA (Figura 3), mentre non vi erano differenze significative nelle VLDL grandi. L'attività della LPL nel tessuto adiposo era significativamente ridotta con la dieta ricca in SAFA (Figura 4), sia in condizioni di digiuno che, più marcatamente, 6 ore dopo il pasto (150±88 e 249±239 nmol FA/g t.a./h, $p<0,05$).

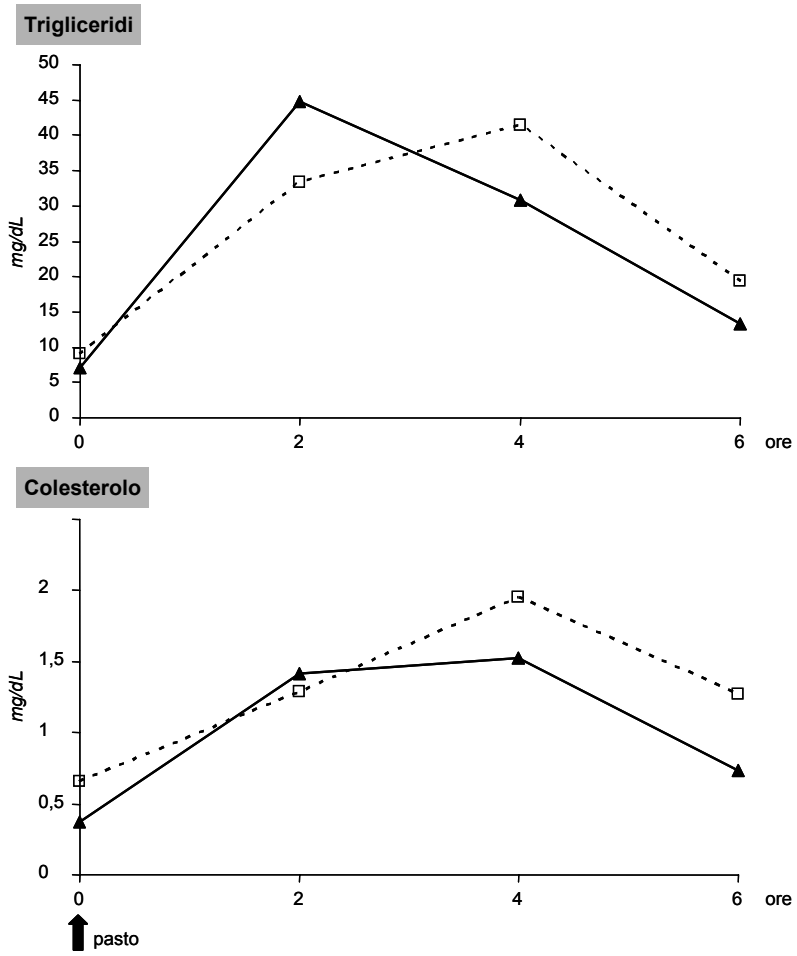

Figura 3. Livelli di trigliceridi e colesterolo nei chilomicroni in risposta ad un pasto ricco in grassi dopo una dieta riccain acidi grassi monoinsaturi (MUFA ▲——▲) e in acidi grassi saturi (SAFA □·····□) in pazienti diabetici in sovrappeso

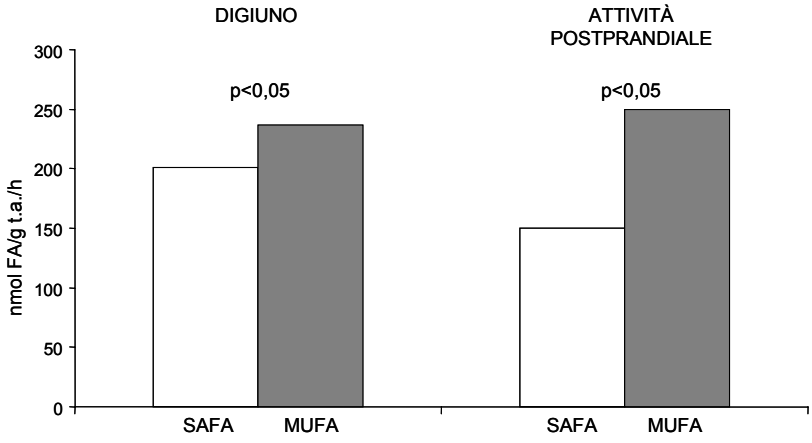

Figura 4. Attività della LPL nel tessuto adiposo dopo una dieta ricca in acidi grassi saturi (SAFA) o in acidi grassi monoinsaturi (MUFA)

Conclusioni

In pazienti con diabete mellito tipo 2 e sovrappeso, una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi per 3 settimane sembra non modificare il livello di insulino-sensibilità e la risposta postprandiale delle VLDL più grandi rispetto ad una dieta ricca in acidi grassi saturi, mentre, invece, sembra indurre una ridotta risposta dei chilomicroni nella fase postprandiale tardiva, probabilmente a causa di una aumentata attività della LPL del tessuto adiposo.

Bibliografia

1. Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Int Med* 1999;246:341-55.
2. Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Annuzzi G. Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(5):2153-9.
3. Annuzzi G, De Natale C, Iovine C, Patti L, Di Marino L, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Rivellese AA. Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(12):2397-402.
4. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 2002;45(9):1201-10.
5. Patti L, Romano G, Di Marino L, Annuzzi G, Mancini M, Riccardi G, Rivellese AA. Abnormal distribution of VLDL subfractions in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: could plasma lipase activities play a role? *Diabetologia* 1993;36(2):155-60.
6. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004;23(4):447-56.
7. Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nalsen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffettone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 2001;44(3):312-9.

EFFETTO DELLE STATINE SULL'INSULINO-RESISTENZA IN PAZIENTI CON OBESITÀ SEVERA: VALUTAZIONE DEI POSSIBILI MECCANISMI D'AZIONE

Maria Elisa Berselli, Sabrina Maestrini, Giulio Savia, Alessandro Minocci, Amelia Brunani, Anna Maria Di Blasio, Antonio Liuzzi
Laboratorio Biologia Molecolare e Dipartimento di Medicina Interna, Ospedale S. Giuseppe, Istituto Auxologico Italiano, Verbania

Introduzione

Trial clinici eseguiti su grosse casistiche hanno indicato che il trattamento con le statine riduce il rischio di ulteriori complicazioni coronariche e la mortalità totale nei pazienti che abbiano sofferto di malattia coronarica acuta (1). Le statine sono una classe di farmaci in grado di diminuire la sintesi di colesterolo e aumentare i recettori epatici per le lipoproteine LDL (*Low Density Lipoprotein*). Esse, infatti, sono in grado di esercitare un'inibizione competitiva dell'enzima 3-idrossi-metil-glutaril-CoA (2, 3). Questi due meccanismi a loro volta determinano una diminuzione dei lipidi circolanti e una diminuzione dei livelli di trigliceridi, contribuendo a ridurre il processo aterosclerotico (4, 5). Negli ultimi anni è stato però evidenziato che le statine possono agire anche sullo stato infiammatorio (6) e sulla funzionalità endoteliale (7), diminuendo il rischio cardiovascolare con meccanismi che sono in parte o del tutto indipendenti dall'effetto sulla diminuzione dei lipidi. Recentemente, numerose evidenze sperimentali sembrano indicare che le statine potrebbero avere un effetto benefico anche su altre patologie quali le malattie autoimmuni e il diabete (8, 9).

Tutti i noti meccanismi di azione delle statine potrebbero, da soli o in concerto, svolgere un ruolo primario nella prevenzione o nel miglioramento del diabete. Tuttavia, un chiaro meccanismo d'azione non è stato ancora identificato e non si può escludere che gli effetti osservati siano dovuti ad altre proprietà di questi farmaci. Alla luce di tali risultati, lo scopo del presente studio è stato approfondire ulteriormente l'effetto delle statine sul diabete e identificare possibili altri meccanismi d'azione. A tale scopo, è stato studiato un campione di soggetti obesi con alterato test di tolleranza al glucosio per valutare l'effetto preventivo delle statine sull'insorgenza del diabete e l'azione delle statine sull'insulino-resistenza attraverso la possibile modificazione dell'espressione del GLUT4 a livello del tessuto adiposo sottocutaneo.

Pazienti e metodi

Lo studio comprende 23 pazienti (16 donne e 7 uomini; età 50±13 anni) con obesità di II e III grado (*Body Mass Index*, BMI 41,5±6 kg/m^2) e con ridotta tolleranza glucidica, definita come glicemia compresa tra 140 e 200 mg/dL dopo 2 h dal carico di glucosio (75 g), sottoposti ad un protocollo che prevede la valutazione di vari parametri metabolici. In dodici di essi, in condizioni basali, è stata eseguita un'agobiopsia del tessuto adiposo sottocutaneo in area periombelicale. Successivamente, 4 di questi pazienti sono stati trattati con la sola dieta e 8 con la dieta più la somministrazione di simvastatina alla dose di 20mg/die. Dopo un anno di trattamento, i soggetti sono stati rivalutati clinicamente e sottoposti ad una nuova biopsia di

tessuto adiposo. Per studiare l'espressione del GLUT4, è stato estratto l'RNA totale dal tessuto adiposo ottenuto dalla biopsia e successivamente analizzato mediante *real-time* PCR.

Risultati

I livelli di espressione del GLUT4 nel gruppo dei pazienti trattati con dieta più simvastatina non presentano alcuna differenza significativa quando paragonati a quelli nel gruppo dei pazienti trattati con sola dieta, pur evidenziando un trend positivo (Figura 1).

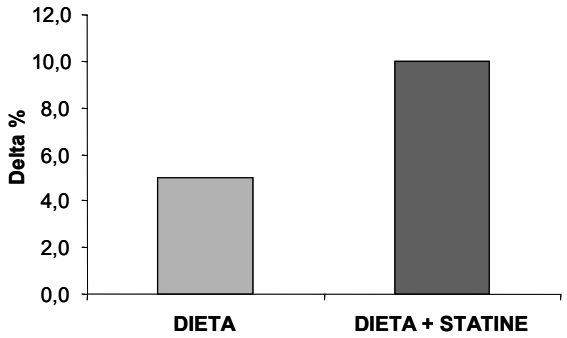

Figura 1. Variazione % dell'espressione del Glut4 in soggetti obesi trattati per un anno con sola dieta o con la dieta più simvastatina

È stato poi valutato se i due trattamenti fossero caratterizzati da valori significativamente diversi dei parametri clinici, metabolici e antropometrici. Esaminando e confrontando i soggetti trattati con dieta più simvastatina rispetto ai soggetti trattati con sola dieta, abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa delle variabili VES (Velocità di EritroSedimentazione), proteina C, colesterolo totale e colesterolo LDL.

I livelli di fibrinogeno, glucosio basale e carico glucidico, insulina, Homa-IR (*Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance*), colesterolo HDL (*High Density Lipoprotein*) e trigliceridi non mostrano invece alcuna differenza statisticamente significativa (Tabella 1 e 2).

Tabella 1. Parametri antropometrici e metabolici dei soggetti obesi trattati con sola dieta

Parametro	Pre trattamento	Post trattamento	p
Peso (kg)	104,67±5,9	95,45±15	-
BMI (kg/m^2)	39,5±2,3	36,4±2,5	-
Fibrinogeno (mg/dL)	439,25±106,44	460,5±77,09	-
VES	18,5±6,2	23,5±7,2	-
Proteina C (mg/dL)	1,002±0,64	0,94±0,64	-
Glucosio basale (mg/dL)	98,25±12,14	96,25±14,08	-
Carico glicemico (mg/dL)	156,5±5,35	136±20	-
Insulina (mU/L)	14,4±5,06	10,7±4,9	-
Homa-IR	3,58±1,71	2,65±1,65	-
Colesterolo totale (mg/dL)	199,5±49,8	187±26,3	-
HDL-colesterolo (mg/dL)	54,0±19,54	57,25±21,7	-
LDL-colesterolo (mg/dL)	120,0±25,0	109,75±17,83	-
Trigliceridi (mg/dL)	151,75±65,0	144,0±60,0	-

I valori rappresentano le medie ± DS. Differenza significativa ($p<0,05$) pre trattamento *vs* post trattamento

Tabella 2. Parametri antropometrici e metabolici dei soggetti obesi trattati con dieta più simvastatina

Parametro	Pre trattamento	Post trattamento	p
Peso (kg)	106,75±6,4	94,88±12	-
BMI (kg /m^2)	40,85±3,8	36,08±1,62	-
Fibrinogeno (mg/dL)	370,83±124,96	371,16±32,07	-
VES	28,0±7,0	13,0±6,2	<0,005
Proteina C (mg/dL)	1,013±0,6	0,38±0,29	<0,005
Glucosio basale (mg/dL)	85,5±3,6	86,7±7,84	-
Carico glicemico (mg/dL)	139,33±0,81	130,0±15,32	-
Insulina (mU/L)	14,1±5,37	11,46±5,22	-
Homa-IR	2,96±1,11	2,39±0,96	-
Colesterolo totale(mg/dL)	201,83±11,08	152,5±29,5	<0,05
HDL-colesterolo (mg/dL)	54,33±13,5	61,2±17,4	-
LDL-colesterolo (mg/dL)	127,16±6,3	76,83±20,0	<0,05
Trigliceridi (mg/dL)	147,2±50,0	132,83±48,2	-

I valori rappresentano le medie ± DS. Differenza significativa ($p<0.05$) pre trattamento *vs* post trattamento,

I dati di questo studio confermano gli studi eseguiti precedentemente riguardo l'azione pleiotropica esercitata dalle statine sia sulla dislipidemia che sugli indici infiammatori (2). Emerge, inoltre, che nessuno dei soggetti studiati ha sviluppato diabete. Tuttavia, un chiaro meccanismo d'azione non è stato ancora identificato e non è possibile distinguere se gli effetti osservati siano dovuti al trattamento con la sola dieta oppure al trattamento con la simvastatina. In conclusione, possiamo dire che il trend in aumento osservato nell'espressione del GLUT4 e in diminuzione nei valori di HOMA-IR giustificano ulteriori indagini su una casistica comprendente un numero maggiore di soggetti.

Bibliografia

1. Sposito AC, Chapman MJ. Statin therapy in acute coronary syndromes. Mechanism insight into clinical benefit. *Atherioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1524-34.
2. Peter H Jones. Comparing HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Cardiol* 2003; 26 (Supl.-I):I15-I20.
3. Istavan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001;292(5519):1160-4.
4. Futtermann LG and Lemberg L. Statin pleiotropy: fact or fiction? *Am J Crit Care* 2004;13(3):244-9.
5. Libby P, Aikawa M. Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability. *Clin Cardiol* 2003;26(Supl-I):I11-I14.
6. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Prevastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001;103:926-33.
7. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antalin J, Sanchez-Pascala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelian-1 and endothelian nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-9.
8. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely DG, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer R, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Gaw A. Pravastatin and the development of diabetes mellitus. Evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001;103:357-62.

9. Paolisso G, Barbagallo M, Petrella G, Ragno E, Barbieri M, Giordano M, Varricchio M Effects of simvastatin and atorvastatin administration on insulin resistance and respiratory quotient in aged dyslipidemic non-insulin dependent diabetic patients. *Atherosclerosis* 2000;150:121-7.

RIDUZIONE DELL'OBESITÀ E FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Roberto Lorenzet
Unità di Biologia Cellulare e Molecolare della Coagulazione Ematica "Antonio Taticchi", Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro (Chieti)

Le evidenze scientifiche accumulate negli ultimi anni hanno indotto l'Americam Heart Association a classificare l'obesità come maggiore e modificabile fattore di rischio per la malattia cardiovascolare (1).

L'obesità è, infatti, frequentemente associata a disordini vascolari propriamente detti, quali arteriopatia coronarica e cerebrale, vene varicose e trombosi venosa profonda e a disordini metabolici, quali dislipidemia, resistenza all'insulina e diabete di tipo 2, che sono anch'essi importanti determinanti della malattia aterotrombotica.

La relazione tra obesità e rischio cardiovascolare è complessa: mentre alcuni ricercatori hanno riportato che la connessione è indiretta e dipendente da un'aumentata prevalenza di diabete, ipertensione e dislipidemia, altri propongono l'obesità di per sé come fattore di rischio indipendente per i disordini cardiovascolari.

Questo secondo punto di vista è supportato da studi prospettici che suggeriscono che l'obesità possa essere considerata un fattore di rischio per la malattia cardiovascolare in modo indipendente dai fattori di rischio standard, e cioè pressione del sangue, colesterolo totale, colesterolo HDL e diabete, che da soli non possono spiegare tutti gli eventi cardiovascolari associati all'obesità. Studi clinici e studi di base suggeriscono che il contributo dell'obesità come fattore di rischio indipendente potrebbe essere mediato da quelli che vengono definiti fattori di rischio emergenti o non convenzionali. Tra questi, un ruolo importante viene assegnato alla proteina C reattiva, al tumor necrosis factor (TNF), all'interleuchina (IL)-6, all'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI)-1 e al *tissue factor* (TF). Parliamo cioè di fattori proinfiammatori e protrombotici (2).

Coagulazione e fibrinolisi, il cui bilancio determina o meno l'insorgenza di uno stato protrombotico, assieme all'infiammazione, costituiscono una triade i cui componenti sono strettamente interconnessi. L'infiammazione è, infatti, frequentemente accompagnata dall'attivazione della coagulazione, e la trombosi, quasi invariabilmente, è causa di una reazione infiammatoria. In modo simile l'infiammazione può influenzare i parametri del sistema fibrinolitico, i cui componenti possono, a loro volta, modulare il processo infiammatorio. L'insorgere del processo infiammatorio avrà quindi come conseguenza l'insorgere dell'aterotrombosi.

Il compito del processo coagulativo è quello di convertire il fibrinogeno circolante solubile in fibrina insolubile. L'innesco, *in vivo*, è determinato dal TF, molecola trasmembrana che, legandosi al fattore VII attivato, forma un complesso dotato di notevole attività catalitica (3). I substrati primari del complesso TF/VIIa sono i fattori IX e X, che vengono convertiti rispettivamente nei loro derivati attivi IXa e Xa, determinando in questo modo la generazione di trombina, a sua volta responsabile della trasformazione del fibrinogeno in fibrina, la maggior componente del coagulo (Figura 1). Il processo di attivazione è molto veloce e richiede che le cellule in diretto contatto con il flusso sanguigno non esprimano il TF, onde evitare l'attivazione della coagulazione in circolo. Infatti, studi immunoistochimici hanno evidenziato la localizzazione del TF nelle capsule che circondano gli organi, nelle cellule delle superfici

epiteliali e, più generalmente, nelle barriere tessutali tra il corpo e l'ambiente esterno (4). Questa distribuzione è compatibile con l'ipotesi che il TF rappresenti un involucro il cui compito sarebbe quello di arrestare la perdita di sangue che si verifica in seguito a un danno tessutale.

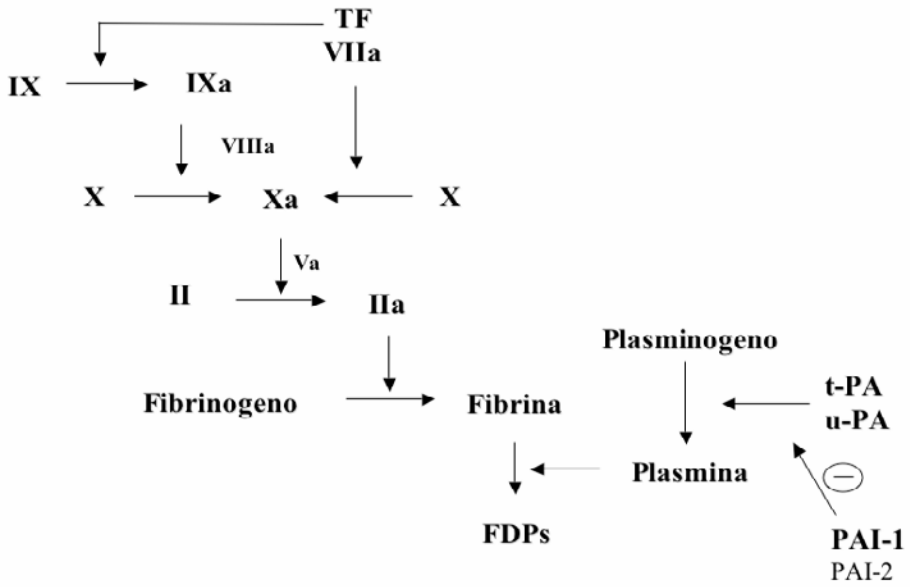

Figura 1. Rappresentazione schematica dei processi della coagulazione e della fibrinolisi. TF, tissue factor; IX, X, II, fattori della coagulazione; IXa, Xa, IIa, Va, VIIIa, forme attivate dei fattori della coagulazione; t-PA, attivatore del plasminogeno di tipo tessutale; u-PA, attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico; PAI-1 e -2, inibitori dell'attivatore del plasminogeno; FDPs, prodotti di degradazione della fibrina.

In circostanze normali i leucociti e le cellule endoteliali che ricoprono la parete del vaso non esprimono né l'attività, né l'antigene del TF. Tuttavia queste cellule, in seguito a stimolazione appropriata, possono essere indotte a sintetizzare e a esprimere il TF sulle loro membrane (5). Agenti in grado di indurre la sintesi di TF in queste cellule sono l'endotossina batterica (lipopolisaccaride, LPS), l'IL-1β, l'IL-6 e il TNFα, agenti fisiologicamente rilevanti che sono espressi in un numero elevato di patologie tra cui il processo infiammatorio.

Quindi l'espressione del TF sulle membrane di monociti e cellule endoteliali, e la conseguente attivazione della coagulazione, è potenzialmente coinvolta nella formazione di un trombo in una varietà di condizioni patologiche tra le quali i disordini immuno-infiammatori.

Per contro, il sistema fibrinolitico ha il compito di degradare il coagulo di fibrina mediante la plasmina (Figura 1). Questa circola nel sangue come proenzima, il plasminogeno, che viene attivato dagli attivatori del plasminogeno: l'attivatore di tipo tessutale (t-PA) e quello di tipo urochinasico (u-PA). L'inibizione del sistema fibrinolitico viene determinata dal PAI-1 e PAI-2 (6).

PAI-1 e TF sono correlati ai disordini cardiovascolari. Il TF è espresso nelle placche aterosclerotiche (sia nella matrice extracellulare del "core" necrotico che nelle cellule che compongono la placca), è attivo e la sua concentrazione correla con la trombogenicità della placca. Inoltre, aumentati livelli plasmatici dell'antigene del TF sono osservati in pazienti con sindrome coronarica acuta e un'aumentata espressione di TF è rilevata nei monociti dei pazienti con angina instabile (7). In modo analogo l'antigene e l'mRNA del PAI-1 sono presenti nelle

lesioni aterogeniche e i livelli plasmatici dell'antigene sono rilevati in pazienti con malattia cardiovascolare (8).

Il terzo componente della triade, l'infiammazione, è analogamente associato all'insorgenza della malattia cardiovascolare: pazienti con sindrome coronarica e, più in generale, pazienti esposti a fattori di rischio per la malattia cardiovascolare presentano livelli plasmatici elevati di numerose citochine infiammatorie (9). Alcune di queste citochine, come IL-1β, IL-6, TNFα, e CD40L, sono in grado di indurre l'espressione di TF e PAI-1.

Sulla base di queste osservazioni si può ipotizzare che le molecole coinvolte nei processi che compongono questa triade siano potenzialmente in grado di svolgere un ruolo di primaria importanza nell'associazione tra obesità e rischio di malattia cardiovascolare.

Nel plasma di soggetti obesi, infatti, alcune di queste molecole sono presenti in alte concentrazioni, o comunque a concentrazioni più alte rispetto a quelle del plasma dei soggetti non obesi. Queste molecole comprendono ad esempio i) l'IL-6, che, come già detto, induce la sintesi di TF e di PAI-1, aumenta i trigliceridi e la concentrazione di acidi grassi liberi, e ii) il TNFα, che, oltre a presentare le stesse proprietà, stimola anche la formazione di IL-6 e la secrezione di leptina negli adipociti. Per quanto riguarda il tessuto adiposo sappiamo che non è un semplice deposito passivo per l'immagazzinamento delle calorie in eccesso. Gli adipociti, infatti, sono cellule metabolicamente attive che secernono un numero consistente di proteine tra le quali le molecole infiammatorie sono ampiamente rappresentate (10) (Figura 2).

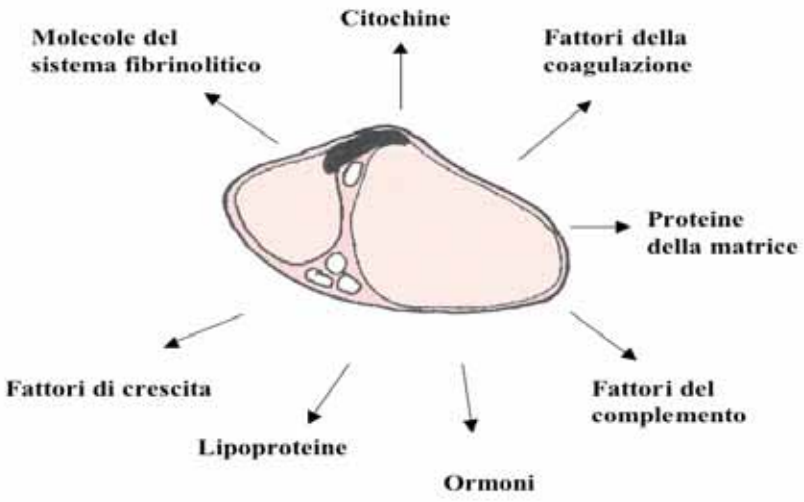

Figura 2. Attività biosintetiche degli adipociti

Possiamo quindi considerare l'obesità come un processo che ha le caratteristiche di uno stato infiammatorio. A supporto di questa ipotesi, un recente lavoro ha documentato che le cellule mononucleate di soggetti obesi presentano livelli elevati di mRNA codificante per IL-6, TNFα, fattore inibitorio della migrazione e metalloproteasi di matrice-9. Queste cellule circolano quindi in uno stato proinfiammatorio (11).

In virtù di queste considerazioni abbiamo iniziato uno studio supportato dal Ministero della Salute coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità che si prefigge di verificare se, in corso di restrizione calorica in soggetti obesi, si verifichi una diminuzione dei livelli plasmatici e

dell'attività di TF, PAI-1, IL-6 e TNFα e se questa diminuzione sia meglio correlabile con la perdita di peso globale, massa adiposa in generale o con la perdita specifica di grasso addominale.

Si intende inoltre verificare se un eventuale miglioramento della resistenza all'insulina sia meglio correlabile con la perdita di peso globale, con la perdita di massa adiposa, o con la perdita di grasso addominale.

A questo scopo sono stati reclutati soggetti obesi esenti da malattie cardiovascolari ai quali è stato effettuato un prelievo basale e per la determinazione di parametri biochimici, un test per la tolleranza orale al glucosio, un esame bio-impedenziometrico per la misura della massa grassa e risonanza magnetica nucleare per la quantizzazione del grasso intraperitoneale e sottocutaneo. Questi soggetti vengono sottoposti a una dieta ipocalorica personalizzata che mira a indurre un calo ponderale di circa il 5% del peso corporeo.

Inoltre, viene valutato se il mezzo condizionato di adipociti in coltura induca l'espressione di TF in cellule endoteliali *in vitro*. A questo scopo vengono impiegati preadipociti 3T3-L1 da embrione di topo che vengono differenziati in adipociti (L1) mediante trattamento con insulina e desametasone. L'effetto del mezzo condizionato, prelevato a diversi intervalli di tempo, viene studiato su cellule endoteliali di cordone ombelicale umano e l'attività di TF viene valutata mediante un test di coagulazione ad uno stadio.

Lo studio, attualmente in fase operativa e con campionatura non ancora sufficiente per un'adeguata analisi statistica, fornirà elementi importanti per una migliore conoscenza degli eventi coinvolti nell'insorgenza dell'obesità e delle complicante ad essa correlate.

Bibliografia

1. Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. *Circulation* 1998;97(21):2099-100.
2. Sowers JR. Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med* 2003;115(Suppl 8A):37S-41S.
3. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988;71(1):1-8.
4. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989;134:1087-97.
5. Lorenzet R, Napoleone E, Celi A, Pellegrini G, Di Santo A. Cell-cell interaction and tissue factor expression. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9(Suppl 1):S49-59.
6. Lijnen HR, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8(2):277-90.
7. Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1997;349(9054):769-71.
8. Carmeliet P, Collen D. Molecular genetics of the fibrinolytic and coagulation systems in haemostasis, thrombogenesis, restenosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8(2):118-25.
9. Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;169(2):203-14.
10. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. A molecular view of adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16(Suppl 2):S17-21.
11. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004;110(12):1564-71.

L'IPERINSULINISMO CRONICO INIBISCE LA CAPTAZIONE DEL GLUCOSIO IN MIOBLASTI UMANI

Anna Bertacca, Annamaria Ciccarone, Paolo Cecchetti, Barbara Vianello, Incoronata Laurenza, Margherita Maffei, Chiara Chiellini, Stefano Del Prato, Luca Benzi
Sezione di Diabetologia, Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Università di Pisa, Pisa

Introduzione

Esistono prove sperimentali che l'iperinsulinismo cronico (1) influenza l'azione dell'insulina intervenendo a diversi livelli della catena di trasduzione del segnale insulinico. Questo concetto è stato dimostrato sia *in vivo* che *in vitro* (2-4), ma rimane ancora da chiarire il meccanismo molecolare che ne sta alla base. I lavori eseguiti su cellule muscolari ottenute da modelli animali o da pazienti con diabete tipo 2 e/o obesità, estrapolano inoltre l'influenza dell'iperinsulinismo da contesti ambientali molto più complessi per la presenza di altri fattori potenzialmente interferenti come TNFα, acidi grassi e iperglicemia (5-7). Da qui l'importanza di usare un sistema *in vitro*, che permette di fornire informazioni sul ruolo dell'iperinsulinismo cronico indipendentemente dalla presenza di altre alterazioni ormonali e metaboliche. Pertanto abbiamo studiato la trasmissione del segnale insulinico in mioblasti umani cresciuti (4-6 settimane) in presenza di basse (107 pmol/L – SkMC-L) o alte (1430 pmol/L – SkMC-H) concentrazioni di insulina e di normali livelli di glucosio (5,5 mmol/L).

Materiali e metodi

Le cellule muscolari scheletriche umane (mioblasti derivati da biopsie di feti tra la $15^a/22^a$ settimana di gestazione – SkMC 2859, Cambrex, USA) sono state coltivate a 37°C, in atmosfera al 5% di CO_2 in mezzo SkGM con l'aggiunta dell'1% di FBS, in presenza di basse concentrazioni di insulina (107 pmol/L – SkMC-L) e di alte concentrazioni di insulina (1430 pmol/L – SkMC-H), in condizioni di normoglicemia (5,5 mmol/L).

I livelli di attivazione di PI3k sono stati misurati mediante immunoprecipitazione e cromatografia su strato sottile (TLC).

I livelli di espressione e di fosforilazione di IR, IRS1, Akt, nelle suddette condizioni di coltura e dopo stimolo acuto con insulina (10^{-8}M per 10'), sono stati valutati mediante immunoprecipitazione e immunoblotting.

Il trasporto del glucosio è stato valutato misurando l'incorporazione di 2-deossi-D-(3H)glucosio. Le cellule sono state incubate con 2-deossi-D-(3H)glucosio, solubilizzate e la radioattività incorporata è stata misurata con un contatore-β.

Risultati

L'incremento della concentrazione di insulina da 107 pmol/L (SkMC-L) a 1430 pmol/L (SkMC-H) nel mezzo di incubazione provoca un aumento del livello di fosforilazione di IR (+72%) e IRS1 (+100%; $p<0,01$).

Dopo stimolo acuto con insulina (10^{-8} M per 10 min) si osserva un incremento nel livello di fosforilazione di IR e IRS1 (+77% e +106% rispettivamente) nelle cellule di controllo, ma nessun ulteriore aumento nelle SkMC-H. Di particolare interesse è il fatto che la massima attivazione di IR e IRS1 è simile in entrambe le condizioni di cultura. L'espressione delle proteine IR e IRS1 nelle SkMC-H non differisce da quella presente nelle SkMC-L. Al fine di escludere un effetto del legame residuo tra l'insulina e il suo recettore dopo una prolungata esposizione ad alte concentrazioni dell'ormone (SkMC-H), le cellule sono state sottoposte a lavaggio acido prima dello stimolo acuto con insulina. Il risultato di questo esperimento ha evidenziato che il pattern di fosforilazione rimane invariato, suggerendo lo sviluppo di un difetto intrinseco alla trasmissione del segnale insulinico nelle SkMC-H.

Inoltre, l'analisi del livello di defosforilazione di IRS-1 dopo stimolo acuto ha evidenziato che la fosforilazione della proteina si riduce di circa il 33% dopo circa 20' nelle SkMC-L, ma non nelle SkMC-H. La ridotta defosforilazione di IRS-1 nelle cellule coltivate in presenza di alte concentrazioni di insulina potrebbe essere una conseguenza degli alti livelli basali di fosforilazione e contribuire di per sè alla demodulazione del segnale insulinico osservato in queste cellule. Infine la valutazione dei livelli di fosforilazione in serina di IRS-1 non ha evidenziato alcuna differenza in entrambe le condizioni di incubazione, così come dopo stimolo acuto con insulina. In cellule cronicamente trattate con alti livelli di insulina, l'attivazione di PI3k risulta significativamente aumentata (+90%, $p<0,05$) rispetto alle cellule di controllo. Dopo stimolo acuto con insulina, analogamente a quanto accade per IR e IRS1, l'attivazione di PI3k aumenta nelle SkMC-L, ma non incrementa ulteriormente nelle SkMC-H.

Il livello di espressione dell'enzima non varia nelle SkMC-H rispetto alle cellule di controllo.

È stata valutata anche la possibilità che l'incubazione con alte concentrazioni di insulina modifichi il legame tra p85 e IRS1. Per cui dopo solubilizzazione delle cellule, IRS1 è stato immunoprecipitato con un anticorpo anti-IRS1 e la frazione di p85 legata ad IRS1 è stata rilevata mediante *western blot* con un anticorpo anti-p85. Il risultato ottenuto mostra un efficace legame tra queste due proteine in entrambe le condizioni di cultura. L'incubazione con elevati livelli di insulina non modifica il livello di fosforilazione di Akt e, dopo stimolo acuto con insulina, il grado di fosforilazione di Akt risulta aumentato solo nelle cellule di controllo (Figura 1A). Infine il trasporto del glucosio nelle SkMC-H è del tutto simile a quello evidenziato nelle SkMC-L e, dopo stimolo acuto, aumenta nelle SkMC-L (+73%), ma non nelle SkMC-H (Figura 1B).

Discussione

Utilizzando mioblasti umani abbiamo studiato gli effetti di elevate concentrazioni croniche di insulina su diverse tappe del segnale insulinico. In queste condizioni, si osserva una maggiore stimolazione di varie proteine del segnale rispetto alle cellule di controllo. Per contro si verifica la totale mancanza di incremento del segnale in risposta ad un ulteriore stimolo insulinico.

Un risultato particolarmente interessante è il comportamento di Akt. Infatti la sua attivazione in presenza di iperinsulinemia non è influenzata dall'aumento di attivazione basale di PI3k e rimane invariata in risposta al successivo stimolo acuto con insulina. Di pari passo con la mancata attivazione di Akt si comporta il trasporto del glucosio, che non si modifica in risposta allo stimolo.

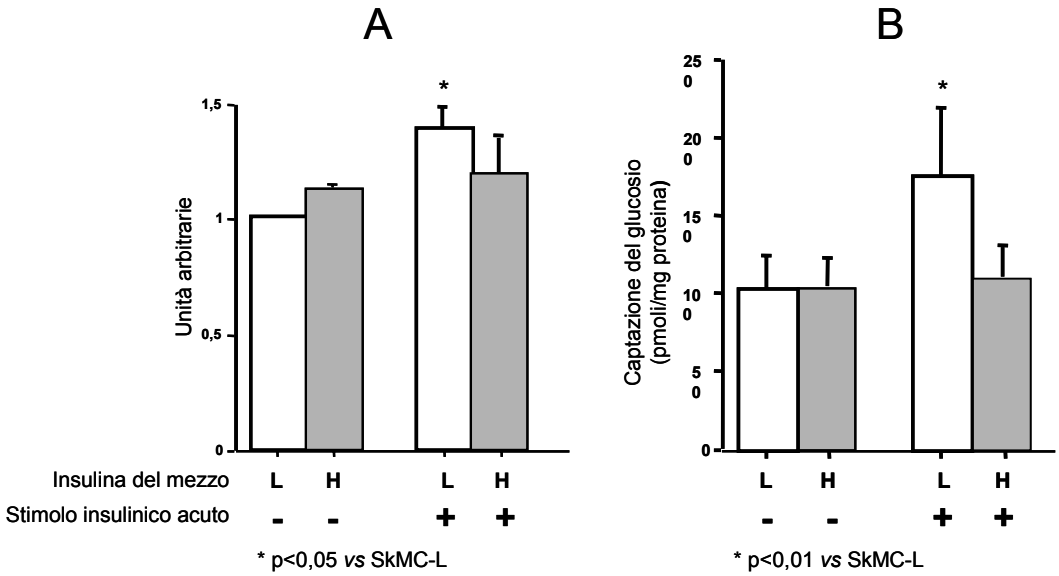

Figura 1. Fosforilazione di Akt (Ser 473) (A) e trasporto del glucosio (B) in cellule cresciute in presenza di basse (107 pmol/L, SkMC-L) o elevate (1430 pmol/L, SkMC-H) concentrazioni di insulina, basalmente e dopo ulteriore stimolo insulinico (10 nM per 10 min)

Questo effetto è molto simile a quanto accade quando cellule muscolari sono studiate in presenza di iperglicemia (8). Possibili meccanismi che possono spiegare almeno in parte i nostri risultati includono l'inibizione di Akt da parte di PDK1 e PDK2 (9) o una sua difettosa traslocazione sulla membrana cellulare (10, 11). Nel loro complesso questi dati suggeriscono un ruolo diretto dell'iperinsulinemia nel determinare una condizione di insulino resistenza a livello del muscolo scheletrico.

Bibliografia

1. Ricort JM, Tanti JF, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Alterations in insulin signalling pathway. *Diabetologia* 1995;38:1148-56.
2. Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;967:120-34.
3. Camastra S, Bonora E, Del Prato S, Rett K, Weck M, Ferrannini E. Effect of obesity and insulin resistance on resting and glucose-induced thermogenesis in man. EGIR (European Group for the Study of Insulin Resistance). *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1999;23:1307-13.
4. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR & Mandarino LJ.. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *Journal of Clinical Investigation* 2000;105:311-20.
5. Pillay TS, Xiao S, Olefsky JM. Glucose-induced phosphorylation of the insulin receptor. Functional effects and characterization of phosphorylation sites. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97:613-20.

6. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation* 1999;103:253-9.
7. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-8.
8. Song X, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes* 1999;48:664-670.
9. Oku A, Nawano M, Ueta K, Fujita T, Umebayashi I, Arakawa K, Kano-Ishihara T, Saito A, Anai M, Funaki M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Inhibitory effect of hyperglycemia on insulin-induced Akt/protein kinase B activation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2001;280:E816-824.
10. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001;24:588-97.
11. Nelson BA, Robinson KA, Buse MG. Defective Akt activation is associated with glucose- but not glucosamine-induced insulin resistance. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2002;282:E497-506.

EFFETTI DELLA LEPTINA SULL'OMEOSTASI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Benedetta Mattioli, Maria Giovanna Quaranta, Luciana Giordani, Marina Viora
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La leptina è una proteina di 16KDa, prodotta principalmente dagli adipociti (1, 2), strutturalmente correlata alla famiglia delle citochine (3). La leptina viene rilasciata nella circolazione sistemica, e i suoi livelli plasmatici correlano con la massa corporea e il bilancio energetico (4). La leptina è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e agire a livello ipotalamico, sede dei meccanismi di regolazione del metabolismo e di importanti funzioni fisiologiche. Le azioni biologiche della leptina sono mediate dall'interazione con un recettore specifico (Ob-R) (5-6). Il recettore Ob-R è prodotto in 6 isoforme diverse (7). Solo l'isoforma lunga (OB-Rb) è in grado di mediare l'induzione di segnali intracellulari in seguito al legame con la leptina (5), attivando la via JAK-STAT con conseguente fosforilazione della proteina STAT3. Il recettore OB-Rb è altamente espresso nell'ipotalamo, in diversi tessuti periferici (8) e sulle cellule del sistema immunitario quali le cellule NK, i linfociti T e B, le cellule CD34+ e i monociti/macrofagi (9,10).

La leptina è principalmente coinvolta nel controllo del bilancio energetico, nella regolazione di diversi sistemi neuroendocrini, nell'ematopoiesi e nella linfopoiesi (11). Inoltre, la leptina induce la proliferazione e la produzione di citochine da parte dei linfociti T, polarizzando il loro differenziamento verso il fenotipo Th1 mentre sopprime il fenotipo Th2 (12). Inoltre, agisce come stimolo proinfiammatorio sui monociti/macrofagi (13,14), inducendone l'attivazione e la produzione di TNFα e IL-6.

Materiali e metodi

Leptina

La leptina ricombinante è stata usata ad una concentrazione finale di 10 nM. Risulta priva di endotossina batterica, come rilevato dal test di Limulus (<0,03 U/mL).

Colture cellulari

I PBMC umani sono stati isolati dal sangue periferico di donatori sani, ottenuto dal Centro Trasfusionale dell'Università Degli Studi "La Sapienza" di Roma. Le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DC) sono state generate *in vitro* da monociti purificati dai PBMC mediante selezione positiva. I monociti così ottenuti, sono stati messi in coltura in presenza di 250 ng/mL di GM-CSF e 100 U/mL di IL-4. Dopo 5 giorni di coltura i monociti si differenziano in DC immature. Il trattamento per 24 ore con 200 ng/mL di LPS induce la maturazione delle DC.

Determinazione dell'attività citotossica

PBMC effettori sono stati coltivati ad una concentrazione di $1x10^4$ cellule/pozzetto in presenza di cellule target K562, come precedentemente descritto (15). Le colture sono state incubate per 4 ore a 37°C; da ogni pozzetto sono stati raccolti 100 µl di supernatante, successivamente sottoposti a lettura in γ-counter (16).

Induzione di una risposta anticorpale antigene-specifica

La risposta anticorpale antigene-specifica è stata ottenuta *in vitro* secondo il protocollo precedentemente descritto (17). L'antigene viene aggiunto ad una sospensione cellulare di PBMC, ad una concentrazione di $1,7x10^6$/mL. Dopo 9 giorni, le colture vengono raccolte e analizzate mediante ELISPOT (18) per la conta delle ASC specifiche verso la mannoproteina della parete cellulare di *C. albicans*.

Western blot e immunoprecipitazione

Per determinare i livelli di espressione del recettore OB-Rb, DC, non trattate o trattate con la leptina, LPS o LPS+leptina, per 24 ore, sono state lisate con tampone di lisi freddo; aliquote di 60 µg sono state caricate su gel SDS-PAGE 8% e analizzate mediante *western blot* usando anticorpi anti-OB-Rb. Per l'immunoprecipitazione di p-STAT3, le cellule sono state lisate in tampone RIPA freddo e 1mg di proteine totali è stato incubato con 2 µg di anticorpo anti-STAT3 per 2 ore a 4°C. I campioni sono stati adsorbiti ad una sospensione di biglie di agarosio coniugate con le proteine A/G per 2 ore a 4°C in agitazione. Gli immunoprecipitati sono stati raccolti per centrifugazione, lavati con tampone RIPA, caricati su gel SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nylon. La rivelazione delle bande è stata fatta utilizzando un anticorpo anti-p-Tyr.

Citofluorimetria a flusso

L'analisi dei marcatori di superficie delle DC è stata effettuata mediante citofluorimetria, utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi. Le cellule sono state raccolte dopo 24 ore di trattamento con la leptina, lavate con PBS 1% e colorate mediante incubazione con gli anticorpi monoclonali per 30 minuti a 4 °C.

Dosaggio delle citochine

La concentrazione delle citochine prodotte dalle DC è stata valutata in supernatanti di coltura di DC non trattate o trattate con leptina, LPS o LPS+leptina per 24 ore. Il dosaggio è stato effettuato mediante un test ELISA-sandwich. Sono stati determinati anche i livelli di mRNA relativi alle varie citochine. L'RNA cellulare totale è stato estratto utilizzando kits commerciali. L'mRNA è stato retrotrascritto in cDNA e amplificato per i geni di interesse mediante il kit Access RT-PCR System. I livelli di mRNA per le citochine sono stati normalizzati ai livelli di mRNA del GAPDH.

Risultati

La leptina potenzia la risposta citotossica mediata dalle cellule NK. La leptina induce un aumento significativo ($p<0.05$) della risposta citotossica mediata dalle cellule NK al rapporto 12,5:1 e 6,25:1 target/effector come illustrato nella Figura 1.

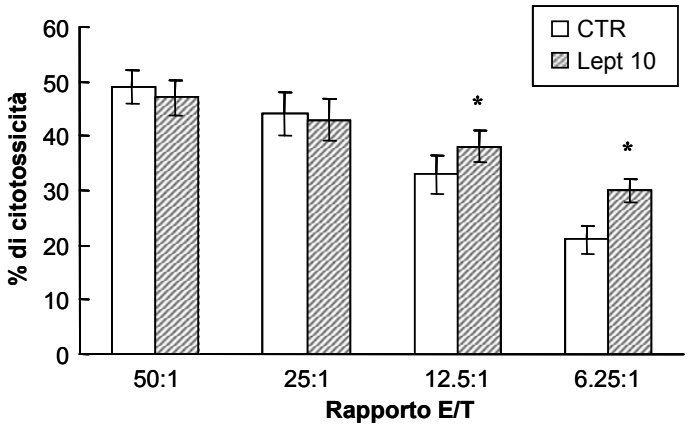

Figura 1. Effetti della leptina sull'attività delle NK

La leptina favorisce l'induzione di una risposta anticorpale specifica. Come mostrato in Figura 2, la leptina aumenta in modo significativo il numero di cellule secernenti anticorpi specifici IgG anti-*C. albicans.*

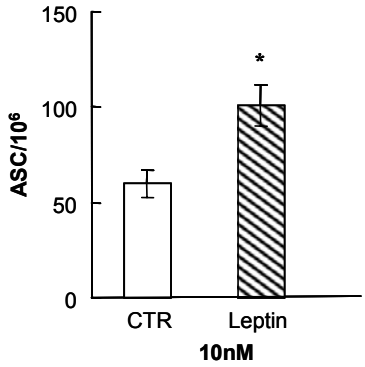

Figura 2. Effetti della leptina sulla produzione anticorpale

Le cellule dendritiche esprimono il recettore OB-Rb. Per determinare l'espressione del recettore della leptina OB-Rb sulle DC, abbiamo valutato i livelli del suo mRNA in DC non trattate o trattate con leptina, LPS o LPS+leptina. Come mostrato nella Figura 3a, l'mRNA del gene *OB-Rb* è espresso sia nelle DC immature (CTR) che nelle mature (LPS) a livelli comparabili. In entrambi i casi, il trattamento con la leptina per 24 ore, induce un aumento nei livelli di espressione. Questo risultato è stato confermato dall'analisi mediante *western blot* dei livelli di proteina OB-Rb (Figura 3b).

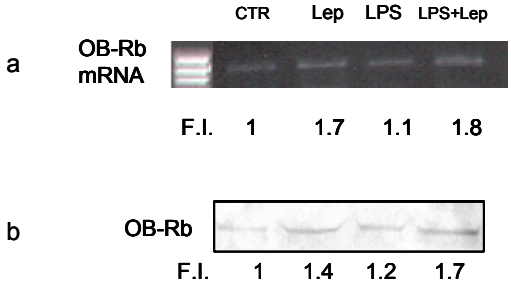

Figura 3. Espressione dell'OB-Rb sulle DC

La presenza del recettore OB-Rb sulle DC umane, rende possibile una risposta di queste cellule alla stimolazione con leptina. È noto che il legame della leptina col suo recettore porta all'attivazione delle chinasi JAK/STAT e quindi alla fosforilazione di STAT3. Abbiamo quindi analizzato la funzionalità del recettore espresso dalle DC, mediante l'analisi dei livelli di STAT3 fosforilata (p-STAT3). Come mostrato in Figura 4, una stimolazione di 30 minuti con la leptina, induce un aumento del livello di p-STAT3 sia nelle DC immature (1.6 volte) che nelle DC contemporaneamente trattate con LPS (1,3 volte), dimostrando l'attivazione del signaling mediato da OB-Rb.

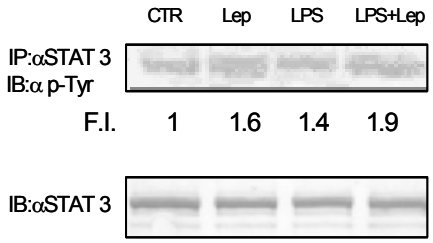

Figura 4. Fosforilazione del fattore di trascrizione STAT3

La leptina non modula il fenotipo delle DC. Per definire l'effetto della leptina sul differenziamento fenotipico delle DC, abbiamo valutato l'espressione di molecole di superficie caratteristiche delle DC immature e mature, dopo trattamento delle cellule con leptina, LPS o LPS+leptina per 24 ore. Come mostrato nelle Figura 5, la leptina non modifica l'espressione delle molecole di presentazione CD1a, HLA di classe I e II, delle molecole di co-stimolo CD86 e CD80 e dell'antigene di maturazione CD83.

La leptina modula la produzione di citochine da parte delle DC. Gli stimoli che inducono il differenziamento e la maturazione delle DC, inducono solitamente la produzione di citochine e chemochine. Abbiamo quindi valutato la capacità della leptina di influenzare il profilo di produzione di questi mediatori, sia a livello di mRNA che di proteina. La Figura 6 mostra che la leptina induce un aumento dei livelli di mRNA dell' IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα e della chemochina proinfiammatoria MIP-1α, mentre induce una diminuzione dei livelli di IL-10 e IL-8. Lo stesso andamento si ottiene trattando le DC con LPS+leptina e confrontandole con DC trattate solo con LPS (DC mature), anche se le differenze risultano meno marcate.

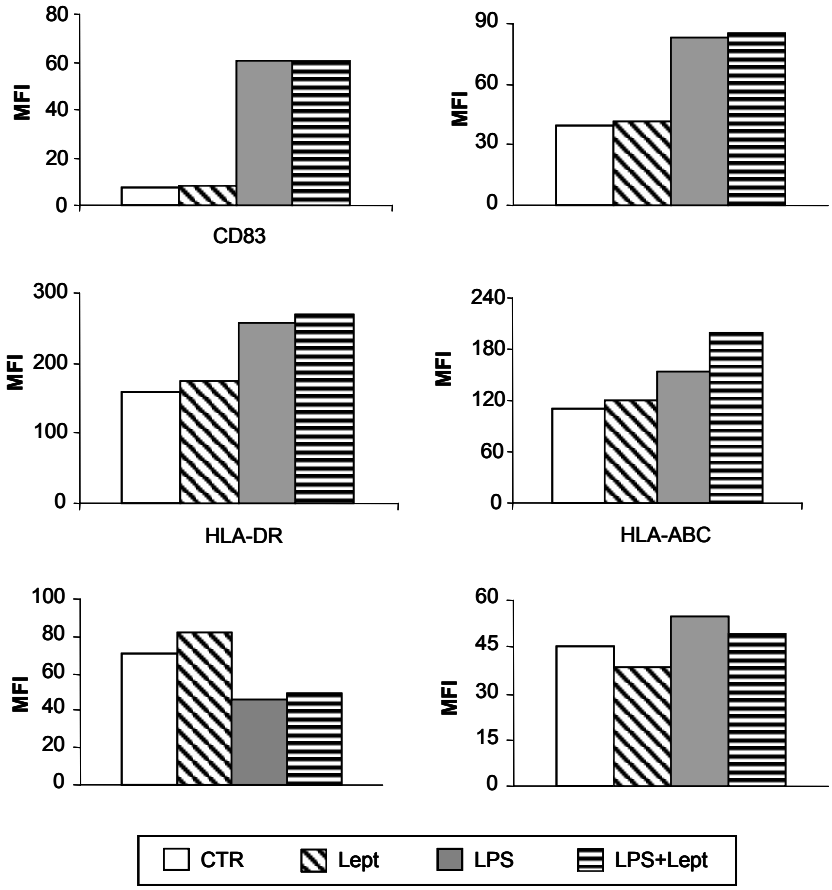

Figura 5. Effetti della leptina sul fenotipo delle DC

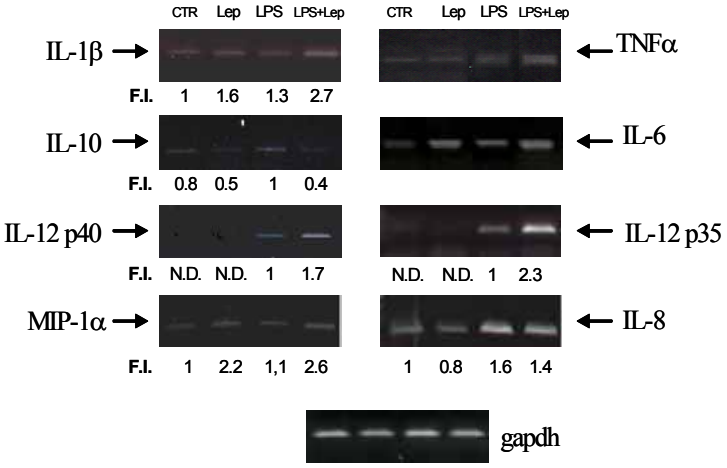

Figura 6. Effetto della leptina sulla produzione di citochine

Per alcune delle citochine analizzate (IL-1β, IL-10, IL-12, TNFα), è stata anche valutata la produzione a livello di proteina mediante test ELISA (Figura 7), e sono stati riconfermati i risultati ottenuti a livello di mRNA.

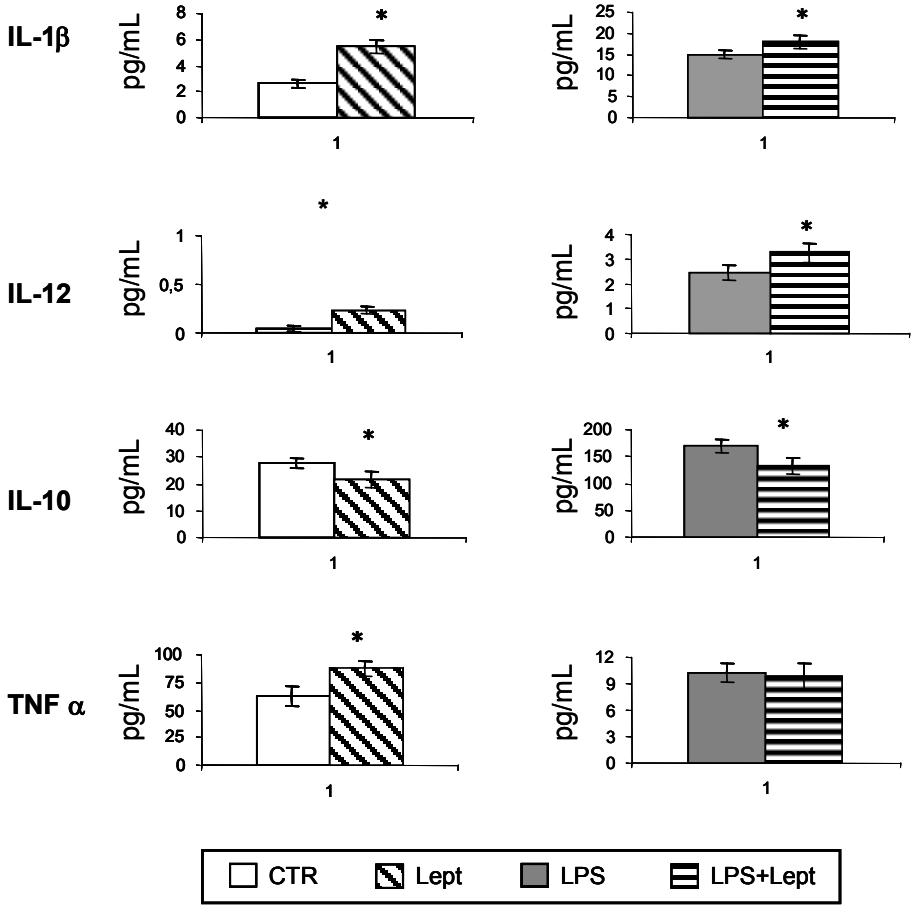

Figura 7. Effetto della leptina sulla produzione di citochine

Conclusioni

Questo studio dimostra che la leptina modula l'omeostasi del sistema immunitario potenziando sia l'attività citotossica mediata dalle cellule NK che l'induzione di una risposta anticorpale specifica da parte dei linfociti B. In letteratura sono ampiamente riportati gli effetti della leptina sui linfociti T e sui monociti/macrofagi. Attualmente non è stato riportato nessun dato riguardante gli effetti della leptina sulle cellule dendritiche. Abbiamo ritenuto importante valutare questo aspetto, essendo le DC le più potenti cellule presentanti l'antigene (APC) cruciali per l'induzione della risposta immunitaria. Sono localizzate in organi non linfoidi, dove captano e processano gli antigeni e in risposta a stimoli infiammatori, prodotti batterici e virali,

vanno incontro a maturazione fenotipica e funzionale acquisendo la capacità di presentare l'antigene ai linfociti T naive e attivare una risposta immunitaria. In questo studio abbiamo dimostrato, per la prima volta, che le DC esprimono il recettore OB-Rb in grado di indurre un signaling intracellulare come dimostrato dalla fosforilazione di STAT3. La leptina non modula l'espressione delle molecole di superficie critiche per la funzione APC delle DC. D'altra parte, la leptina induce la produzione di citochine proinfiammatorie mentre diminuisce la produzione di IL-10, caratteristica delle risposte linfocitarie di tipo Th2. Questi risultati contribuiscono a sostenere l'ipotesi di un possibile impiego della leptina sia a livello immunoterapeutico che come adiuvante nei vaccini contro le infezioni virali.

Bibliografia

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;1:425-32.
2. Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM.. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;18:6957-60.
3. Madej T, Boguski MS, Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 1995;2:13-8.
4. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;1:292-5.
5. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:6093-6.
6. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8374-78.
7. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996;379:632-35.
8. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ. Possible roles of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 1996;2:55-9.
9. Gainsford T, Aexander WS. A role for leptin in hemopoiesis? *Mol Biotechnol* 1999;11:149-58.
10. Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural Killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;300:247-52.
11. Mikhail AA, Beck EX, Shafer A, Barut B, Gbur JS, Zupancic TJ, Schweitzer AC, Cioffi JA, Lacaud G, Ouyang B, Keller G, Snodgrass HR. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood* 1997;89:1507-12.
12. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 2000;199:15-24.
13. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 1997;185:171-5.
14. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999;194:6-11.
15. Zarcone D, Tilden AB, Lane VG, Grosii CE. radiation sensitività of resting and activated nonspecific cytotxic cells of T lineare and NK lineare. *Blood* 1989;73:1615-19.

16. Tilden AB, Zarcone D, Prasthofer EF, Lane VG, Acton RT, Grossi CE. X-linked codominant genes control all types of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity. *Hum Immunol* 1991;30:208-11.

17. Giacomini E, Boccanera M, Tissi L, Bistoni F, Cassone A. Cell wall components of Candida alcicans mannoproteins in cultures of human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol Methods* 1993;164:203-11.

18. Sedgwick JD, Holt PG. ELISA-plaque assay for the detection of single antibody-secreting cells. In: Kemeny DM, Challacombe SJ (Ed.). *ELISA and other solid phase immunoassays.* Chichester: Wiley; 1988. p. 241-63.

LDL OSSIDATE MODULANO L'ADIPOGENESI ALTERANDO L'EQUILIBRIO TRA PROLIFERAZIONE CELLULARE E DIFFERENZIAMENTO

Roberta Masella, Beatrice Scazzocchio, Rosaria Varì, Carmela Santangelo, Carmela Filesi, Roberta Di Benedetto, Massimo D'Archivio, Claudio Giovannini
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Un recente studio (1) condotto in un campione derivante da una coorte di 3537 persone, discendenti dei partecipanti allo studio di Framingham, ha riscontrato una correlazione positiva fra indici di obesità (*Body Mass Index,* BMI; e il *waist/hip ratio*) e i livelli urinari di isoprostani, *marker* di stress ossidativo. Molte altre evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che lo stress ossidativo possa avere un ruolo importante nella patogenesi della obesità ed è altresì da tempo nota la associazione tra stress ossidativo, diabete e arteriosclerosi, che rappresentano le sue principali complicanze cliniche.

LDL (*Low Density Lipoprotein*) ossidate (oxLDL) sono state trovate nel plasma di pazienti con arteriosclerosi, diabete di tipo 2 e, recentemente, anche nel plasma di pazienti obesi (2-4). Le oxLDL modulano la crescita e la produzione di fattori di trascrizione e di citochine, influenzando la proliferazione cellulare, l'apoptosi e il differenziamento (5-8). Questi effetti sono mediati dai cosiddetti recettori *scavenger*, tra i quali il CD36, recettore di classe B, viene espresso anche dagli adipociti (9).

Il tessuto adiposo, oltre alla sua tradizionale funzione di deposito energetico svolge un ruolo importante sia dal punto di vista endocrino che immunologico (10). Gli adipociti, infatti, rispondono a stimoli ormonali, rilasciando a loro volta ormoni e citochine (11). L'omeostasi del tessuto adiposo è il frutto dell'equilibrio tra proliferazione, apoptosi e differenziamento, finemente regolato da diversi fattori (12). In particolare, il reclutamento di nuovi adipociti è reso possibile dalla presenza di preadipociti che, in risposta ad appropriati stimoli, sono capaci di differenziarsi in cellule che hanno le caratteristiche biochimiche e metaboliche degli adipociti maturi. Sono stati identificati diversi fattori di trascrizione che regolano il processo di differenziamento agendo secondo una sequenza temporale ben determinata (13); tra questi il PPARγ ha un ruolo chiave nell'induzione del differenziamento (14-17), mentre il Pref-1, presente nei preadipociti ma completamente assente negli adipociti maturi, è un forte inibitore del differenziamento (18, 19).

Lo studio, articolato in due fasi, aveva come obiettivi principali: *i)* la valutazione del livello di ossidazione e di suscettibilità all'ossidazione della frazione LDL isolata dal plasma di soggetti obesi e, parallelamente, *ii)* la valutazione degli effetti di LDL ossidate sull'equilibrio tra attività proliferativa, induzione di apoptosi e differenziamento nella linea cellulare di preadipociti murini 3T3-L1.

Metodi

Studio *ex vivo*

Sono stati analizzati 19 soggetti obesi e 8 soggetti sani normopeso, tutti di sesso maschile, di età compresa tra 40 e 60 anni, con BMI >30 kg/m^2. Le LDL, isolate dal plasma mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di densità, sono state sottoposte ad ossidazione mediante trattamento con $CuSO_4$ 10 μM per 2 ore a 37 °C. Al termine del periodo di incubazione sono stati valutati, quali indici di suscettibilità all'ossidazione, il contenuto di *TBARs* e la mobilità elettroforetica relativa (*Relative Electyrophoretic Mobility*, REM). Inoltre è stata valutata la lunghezza della *lag-phase*, monitorando la formazione dei dieni coniugati mediante lettura spettrofotometrica a 234 nm, su LDL ossidate con $CuSO_4$ 5 μM a 30 °C.

Lo studio si è svolto in collaborazione con il gruppo di Gabriele Riccardi e Angela Rivellese dell'Università "Federico II" di Napoli.

Studio *in vitro*

Culture cellulari e differenziamento

Preadipociti murini 3T3-L1 sono stati coltivati in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) al 10% di siero fetale di vitello. Il protocollo di differenziamento prevedeva la somministrazione, alle cellule giunte a confluenza (giorno 0), di una miscela di differenziamento (*Differentiation Mixture*, DMIX) contenente insulina 1μM, desametazone 0,25 μM e isobutilmetilxantina 0,5 nM, per 48 ore. Dopo il cambio del terreno, è stata aggiunta nuovamente insulina per altre 48 ore, quindi le cellule sono state mantenute nel terreno di coltura fino al giorno 7. Le LDL ossidate venivano aggiunte insieme alla DMIX e mantenute nel mezzo di coltura per tutto il periodo di differenziamento. Il progresso del differenziamento veniva evidenziato valutando l'accumulo di trigliceridi intracellulari mediante colorazione con Oil Red O, e l'espressione del messaggio per aP2 con RT-PCR.

Isolamento delle LDL dal plasma e loro ossidazione

Le LDL (1,019-1,063 g/mL) sono state isolate dal plasma di volontari sani mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità (21). Le LDL native così ottenute sono state ossidate con $CuSO_4$ 20 μM per 18 h a 37 °C. L'ossidazione è stata quindi bloccata mediante EDTA 1mM e refrigerazione a 4°C.

Determinazione della proliferazione cellulare e apoptosi

I preadipociti murini 3T3-L1 sono stati piastrati in pozzetti da 6, contenenti DMEM addizionato con Ultroser G al 2%. Le cellule, una volta raggiunta la confluenza, sono state trattate con oxLDL 50 mg/L e, dopo un periodo di incubazione di 24 ore, sono state analizzate per attività proliferativa e apoptosi. La proliferazione è stata valutata mediante l'incorporazione di C^{14}-timidina. Le cellule apoptotiche sono state analizzate mediante il kit *ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit* (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA).

RT-PCR e *western blot*

Per tutto il periodo sperimentale (dal giorno 0 al 7), l'RNA totale è stato isolato quotidianamente per valutare, mediante RT-PCR, l'espressione di geni coinvolti nell'adipogenesi, in particolare Pref-1, PPARγ e aP2, quest'ultimo come *marker* di avvenuto

differenziamento. Gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su un gel d'agarosio all'1,5%, e visualizzati mediante marcatura con bromuro d'etidio. I livelli di RNA messaggero sono stati misurati mediante un analizzatore di immagini FX (Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) e sono stati quantificati utilizzando come gene di riferimento il GAPDH. Le proteine nucleari sono state estratte, separate mediante elettroforesi al 12%, trasferite su una membrana di nitrocellulosa e analizzate utilizzando anticorpi specifici per PPARγ.

Risultati e discussione

Studio *ex vivo*

I risultati dello studio sulle LDL dei pazienti obesi sono mostrati in Tabella 1. La concentrazione di TBARs e la velocità di migrazione elettroforetica, misurate dopo stress ossidativo, presentavano valori significativamente più alti nei soggetti obesi rispetto ai controlli; al contrario, la lunghezza della lag-phase era significativamente più bassa. Questi dati indicavano pertanto un aumento della suscettibilità all'ossidazione delle LDL nei pazienti obesi.

I nostri risultati trovano conferma in recenti lavori (22, 23) nei quali si dimostra una chiara correlazione tra BMI e oxLDL circolanti.

Tabella 1. Indicatori di parametri ossidativi in pazienti obesi

Parametri	Unità di misura	Pazienti obesi	Controlli	p
Lag-phase	min	60,39±2,23	74,64±6,85	≤0,05
TBARs	nmol/mg proteina LDL	66,20±5,0	48,8±4,3	≤0,05
REM		1,76±0,13	1,33±0,04	≤0,05

Studio *in vitro*

Si sono valutati gli effetti delle oxLDL sulla capacità proliferativa e sull'induzione di apoptosi nei preadipociti attraverso i saggi di incorporazione di C^{14}-timidina e positività all'Annexin V rispettivamente. Il trattamento di preadipociti murini della linea cellulare 3T3-L1 con oxLDL determinava un significativo aumento dell'incorporazione di timidina marcata rispetto alle cellule di controllo. La presenza di oxLDL non induceva pertanto alcun effetto citostatico, anzi determinava un aumento della capacità proliferativa cellulare (Figura 1A).

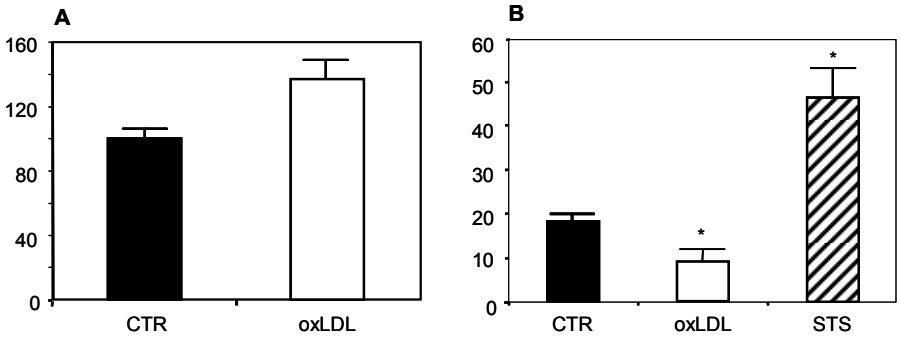

Figura 1. Effetti delle oxLDL sull'attività proliferativa (A) e sull'induzione di apoptosi (B) in cellule preadipocitarie murine 3T3-L1

L'analisi quantitativa delle cellule apoptotiche presenti dopo trattamento con oxLDL indicava una significativa diminuzione del fenomeno apoptotico rispetto ai controlli e soprattutto rispetto al controllo positivo rappresentato da cellule trattate con staurosporina (Figura 1B), che confermava la presenza di una pathway apoptotica funzionalmente attiva in queste cellule. L'insieme di questi risultati dimostrava la mancanza di effetti di tipo citotossico delle oxLDL sulle cellule 3T3-L1, osservazione confermata anche dalla mancata produzione di ROS intracellulari dopo il trattamento con oxLDL. Le oxLDL sembravano piuttosto contribuire al mantenimento di uno stadio "indifferenziato"; i risultati che abbiamo ottenuto studiando il processo di differenziamento delle cellule preadipocitarie in adipociti maturi in presenza di oxLDL hanno confermato queste osservazioni.

Il processo di differenziamento è un evento complesso e finemente regolato, nel quale intervengono molteplici fattori di trascrizione e ormoni. L'acquisizione del fenotipo maturo è accompagnato dall'attivazione di numerosi geni, con conseguente comparsa di mRNA definiti precoci, intermedi e tardivi. Uno dei principale *marker* dell'adipogenesi è costituito dal PPARγ, i cui livelli di mRNA cominciano ad essere cospicuamente presenti nella fase intermedia del processo differenziativo. Parallelamente a questi eventi, vengono repressi quei geni inibitori dell'adipogenesi, il più importante dei quali sembra essere Pref-1, la cui scomparsa costituisce un evento fondamentale affinché il differenziamento abbia luogo.

Al termine del processo differenziativo si ha l'acquisizione del fenotipo adipocitario maturo con accumulo di trigliceridi e acquisizione della sensibilità insulinica.

L'analisi morfologica, mediante colorazione con Oil Red O, ha mostrato che cellule indotte a differenziare in presenza di oxLDL mostravano un evidente riduzione dell'accumulo di trigliceridi e assenza di messaggio per aP2, *marker* dell'adipocita maturo (Figura 2).

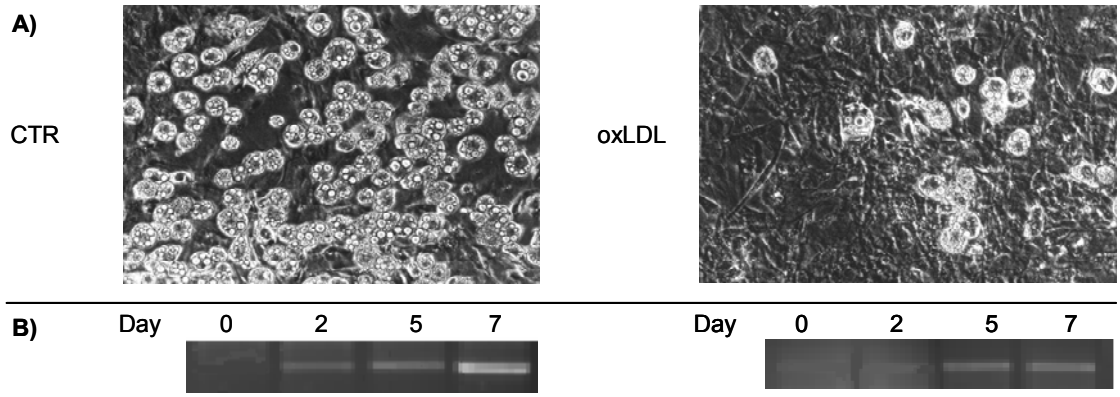

Figura 2. Ruolo delle oxLDL sul differenziamento dei preadipocitari murini 3T3-L1: A) analisi al microscopio ottico mediante colorazione con *Oil Red O* al giorno 7 del differenziamento in cellule di controllo e cellule trattate con oxLDL; B) espressione di aP2 durante tutto il periodo sperimentale

Le oxLDL determinavano quindi un evidente ritardo nel differenziamento cellulare. Per determinare se questo fosse il risultato di una alterazione nel programma di differenziamento abbiamo studiato l'espressione di PPARγ e di Pref-1. Le cellule di controllo mostravano un rapido innalzamento della quantità di messaggero per PPARγ, che raggiungeva un picco a 2 giorni e si manteneva elevato per tutto il periodo sperimentale.

Nelle cellule trattate con oxLDL, invece, il livello di mRNA per PPARγ rimaneva sostanzialmente uguale a quello iniziale (Figura 3A). Inoltre l'analisi *western blot*, condotta al giorno 7, evidenziava una significativa riduzione dell'espressione proteica di PPARγ nelle cellule trattate con oxLDL (Figura 3B).

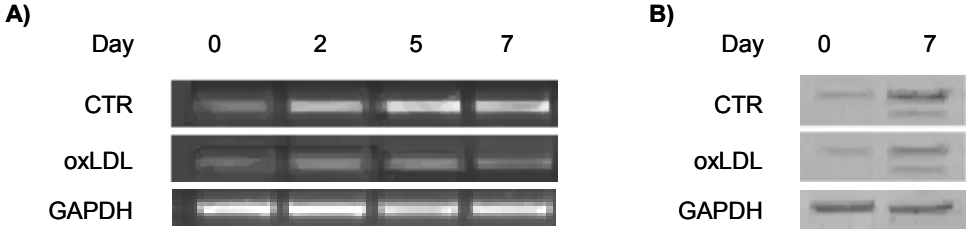

Figura 3. Espressione di PPARγ durante il differenziamento in cellule preadipocitarie murine 3T3-L1. GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento A: mRNA; B: proteina

Ancora più evidenti sono apparsi gli effetti esercitati dalle oxLDL sul Pref-1. Mentre le cellule di controllo mostravano una diminuzione progressiva dell'espressione del suo messaggero, che scompariva quasi del tutto al giorno 7, le cellule trattate con oxLDL mostravano un notevole incremento del mRNA di Pref-1 al giorno 2, che si manteneva più o meno costante per tutto il periodo di osservazione (Figura 4).

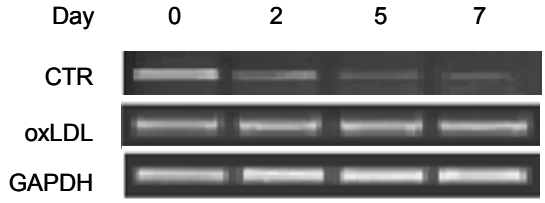

Figura 4. Espressione di PREF-1 durante il differenziamento in cellule preadipocitarie murine 3T3-L1. GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento

Per testare l'ipotesi secondo la quale l'incremento del Pref-1 fosse la principale causa nell'inibizione del differenziamento indotto da oxLDL, abbiamo seguito 2 differenti approcci. Abbiamo valutato gli effetti dello spegnimento del messaggio di Pref-1 utilizzando la metodologia dello *small interfering* RNA (siRNA) che induce la degradazione del messaggio del gene in esame. Come conseguenza del trattamento con siRNA contro Pref-1, le cellule indotte a differenziare in presenza di oxLDL mostravano una marcata riduzione dell'mRNA per Pref-1 (Figura 5A), accompagnato da un significativo aumento della produzione di PPARγ e aP2 comparabile a quello di controllo (dati non mostrati).

Il secondo approccio si basava su dati di letteratura che avevano dimostrato il ruolo centrale del desametazone nel down-regolare il Pref-1, con un meccanismo dose-dipendente. Abbiamo pertanto studiato se concentrazioni più elevate di desametazone fossero capaci di neutralizzare l'aumentata espressione di Pref-1 presente nelle cellule trattate con oxLDL. I risultati hanno dimostrato che una concentrazione di 1 μM, rispetto a quella di 0,25 μM utilizzata nella miscela

di differenziamento, preveniva l'aumento di Pref-1 indotto da oxLDL (Figura 5B) e ristabiliva il normale livello di espressione di PPARγ (dati non mostrati) e la capacità di condurre a buon fine il processo di differenziamento.

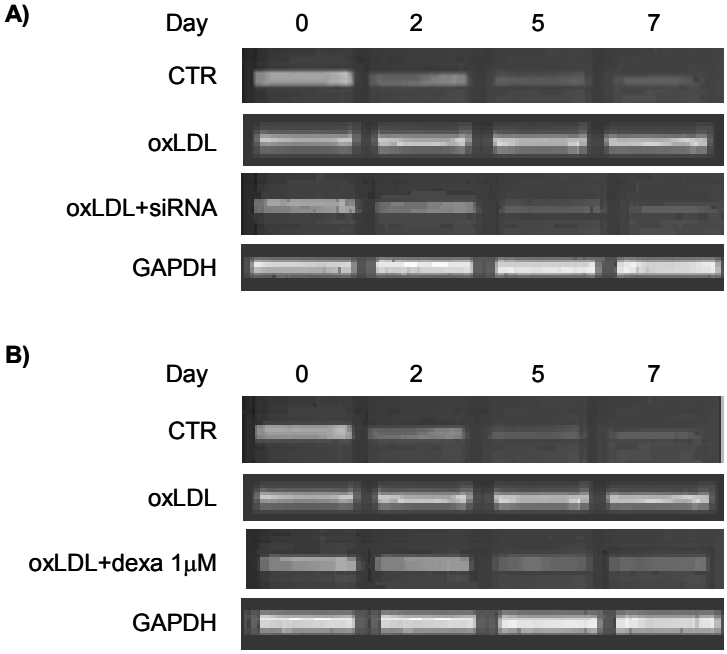

Figura 5. Effetto dell'SiRNA (A) e dell'aumentata concentrazione di Dexa (1μM) (B) sull'espressione di PREF-1 durante il differenziamento in cellule preadipocitarie murine 3T3-L1. GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento

In conclusione i nostri risultati mostrano che le oxLDL, stimolando la proliferazione cellulare e rallentando il processo di differenziamento, aumentano il pool di preadipociti e riducono la percentuale di cellule mature insulino-sensibili.

Poiché il contenuto plasmatico delle oxLDL aumenta in corso di obesità, diabete e arteriosclerosi, come conseguenza dell'alterato equilibrio redox prodotto, esse potrebbero contribuire alla comparsa di insulino-resistenza, alterando i processi cellulari coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi del tessuto adiposo.

Bibliografia

1. Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ; Framingham Study. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):434-9.
2. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2243-7.
3. Kopprasch S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Fuecker K, Temelkova-Kurutschiev T, Hanefeld M, Kuhne, H, Julius U, Graessler J. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2002;51:3102-6.

4. Ho RC, Davy K, Davy B, Melby CL. Whole-body insulin sensitivity, low-density lipoprotein (LDL) particle size, and oxidised LDL in overweight, nondiabetic men. *Metabolism* 2002;51:1478-83.
5. Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585: 213-21.
6. Chisolm GM, Chai YC. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Rad Biol Med* 2000;28:1697-707.
7. Viora M, Straface E, Di Genova G, Fattorossi A, Rivabene R, Camponeschi B, Masella R, Malorni W. Oxidized low density lipoproteins impair peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;232:359-63.
8. Malorni W, Straface E, Di Genova D, Fattorossi A, Rivabene R, Camponeschi B, Masella R, Viora M. Oxidized low density lipoproteins affect natural killer cell activity by impairing cytoskeleton function and altering the cytokine network. *Exp Cell Res* 2002;236:436-45.
9. Abumrad N, El-Maghrabi MR, Amri E, Lopez E, Grimaldi P. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1993;268:17665-8.
10. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* 2000;130:3110S-3115S.
11. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:875-88.
12. Gregoire FM, Smas CM, Sul SH. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809.
13. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee Jr. RE. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Cell Develop Biol* 1999;10:3-10.
14. Morrison RF, Farmer SR. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Cell Biochem* 1999;suppl 32/33:59-67.
15. Grimaldi PA. Roles of lipid-activated receptors in the adipogenic action of fatty acids. *Lipids* 1999;34: S205-S208.
16. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sakihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T. PPARγ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insuline resistance. *Mo. Cell* 1999;4:597-609.
17. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2002;51:2045-55.
18. Sul HS, Smas C, Mei B, Zhou L. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obesity* 2000;24(S4):S15-S19.
19. Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem* 2002;364:137-44.
20. Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1999;274:12632-41.
21. Masella R, Varì R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B, Giovannini C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr* 2004;134:785-91.
22. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, Collen D, Muls E, Van de Werf F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(5):844-8.

23. Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarck R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation* 2003;107(12):1640-6.

24. Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Sanchez M, Masella R., Malorni W. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidised low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett* 2002;523:200-6.

La riproduzione parziale o totale dei Rapporti *e* Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.

Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma

Roma, settembre 2005 (n. 3) 4° Suppl.