

INDICE

CAPITOLO 1	pag. 4
INTRODUZIONE	pag. 4
1.1 IL TESSUTO ADIPOSO COME ORGANO SECRETORIO	pag. 5
1.2 IL TESSUTO ADIPOSO COME ORGANO ENDOCRINO	pag. 6
1.3 ADIPOCHINE CITOCHINE E INFIAMMAZIONE	pag. 7
1.4 INFIAMMAZIONE E OBESITÀ	pag. 15
1.5 POLIMORFISMI DEI GENI DELLE CITOCHINE	pag. 22
1.6 OBESITÀ: RISCHIO CARDIOVASCOLARE E DIABETE TIPO II	pag. 24
CAPITOLO 2	pag. 28
DISORDINI METABOLICI	pag. 28
2.1 SINDROME METABOLICA	pag. 29
2.2 METABOLICALLY HEALTHY BUT OBESE WOMEN (MHO)	pag. 37
2.3 METABOLICALLY OBESE, BUT NORMAL WEIGHT INDIVIDUAL (MONW)	pag. 40
2.4 NORMAL WEIGHT OBESE SYNDROME (NWO): LA SINDROME DE LORENZO	pag. 42

CAPITOLO 3	pag. 50
METODI	pag. 50
3.1 SOGGETTI	pag. 50
3.2 VALUTAZIONE DELLO STATO NUTRIZIONALE E COMPOSIZIONE CORPOREA	pag. 51
3.3 TECNICHE DI VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA	pag. 57
3.4 ANTROPOMETRIA	pag. 59
3.5 IMPEDENZIOMETRIA	pag. 63
3.6 DXA (DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY)	pag. 70
3.7 ANALISI EMATOCHIMICHE	pag. 74
3.8 RICERCA DI BIOMARCATORI	pag. 75
3.9 ELABORAZIONE STATISTICA	pag. 80
CAPITOLO 4	pag. 81
RAZIONALE DELLO STUDIO	pag. 81
CAPITOLO 5	pag. 83

RISULTATI	pag. 83
5.1 RISULTATI POLIMORFISMO IL-1Ra	pag. 83
5.2 RISULTATI POLIMORFISMO -174G/C SUL PROMOTORE GENICO di IL-6	pag. 85
5.3 RISULTATI POLIMORFISMO DI IL-15Rá	pag. 87
CAPITOLO 6	pag. 89
DISCUSSIONE	pag. 89
TABELLE	pag. 92
FIGURE	pag. 97
BIBLIOGRAFIA	pag. 107

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La ricerca scientifica nel campo della Nutrizione Umana ha subito un notevole sviluppo dagli anni '90 ad oggi. Il progressivo e rapido incremento nell'incidenza dell'obesità, che ha caratterizzato nell'ultima decade la maggior parte dei paesi economicamente avanzati, ha costituito, infatti, il principale stimolo per la ricerca dei meccanismi che sottendono questa patologia e i disturbi ad essa correlati. Consideriamo che oggi l'obesità è una vera e propria epidemia e come tale un problema di salute pubblica. Se analizziamo la definizione della World Health Organization (WHO), che la identifica come "un eccessivo accumulo di grasso tale da alterare lo stato di salute dell'individuo", possiamo affermare che l'obesità è definita proprio dall'espansione del tessuto adiposo. E' infatti in questa direzione che la ricerca si è andata orientando nell'ultimo decennio, focalizzandosi proprio sul "tessuto adiposo", quel misterioso sconosciuto, a lungo precedentemente ignorato. Se fino a poco tempo fa, esso era tradizionalmente considerato un mero deposito di lipidi, dunque una riserva energetica, con le uniche funzioni di accumulo, sintesi e degradazione di lipidi, oggi, numerosi studi hanno dimostrato che è un organo estremamente complesso, sia dal punto di vista istologico che metabolico. Il tessuto adiposo è costituito da due distinte componenti: il tessuto adiposo bianco (WAT) e il tessuto adiposo bruno. Il tessuto adiposo bruno rappresenta solo una minima quota

nell'organismo, presente in abbondanza nei neonati e implicato nella termogenesi non indotta da brivido. Il WAT, invece, costituisce la maggioranza e pertanto merita di essere indagato a fondo. A livello cellulare esso mostra una notevole eterogeneità, essendo costituito solo per metà da adipociti maturi, e per il resto da preadipociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule nervose e macrofagi. La complessità è evidente inoltre a livello molecolare; è emerso infatti che gli adipociti bianchi esprimono ben otto differenti trasportatori facilitatori del glucosio della famiglia GLUT. Perciò il processo di ingresso del glucosio in queste cellule può coinvolgere differenti proteine carrier, ognuna con le proprie caratteristiche cinetiche ,e di cui solo una, GLUT 4 ,è insulino-sensibile.

Invero le più importanti conoscenze di cui oggi disponiamo sul tessuto adiposo riguardano il suo ruolo. Lungi dall'essere un tessuto inerte, numerosissimi recenti studi hanno chiaramente dimostrato che il WAT è un organo metabolicamente attivo, essendo in primis un organo secretorio ma soprattutto un vero e proprio organo endocrino.

1.1 IL TESSUTO ADIPOSO COME ORGANO SECRETORIO

Il tessuto adiposo bianco è un importante organo secretorio. Costituisce, infatti, la principale fonte di acidi grassi durante il digiuno, ma rilascia anche molti altri composti di natura lipidica, quali: colesterolo, retinolo, ormoni steroidei e prostaglandine. In realtà colesterolo, retinolo e alcuni prostanoidi non sono sintetizzati dal WAT, ma solo internalizzati e immagazzinati in esso. Al contrario, le

tappe di trasformazione degli ormoni steroidei possono aver luogo negli adipociti bianchi, come l'attivazione dell'11deidrocorticosterone in cortisolo, catalizzata dall'11â-idrossisteroide deidrogenasi tipo1. Inoltre è ormai noto che gli adipociti rilasciano l'enzima lipoproteinlipasi, deputato alla degradazione dei triacilgliceroli circolanti in acidi grassi, i quali, dopo l'uptake e la riesterificazione, vengono immagazzinati in essi.

Alla fine degli anni '80 è stata identificata un'ulteriore proteina di origine adipocitaria, denominata *adipsina*, un fattore complemento-relato, che inizialmente si riteneva essere un segnale diretto nel bilancio energetico, ma che successivamente non è risultata tale.

Un ulteriore passo in avanti nel riconoscimento del ruolo secretorio del WAT è stato compiuto nei primi anni '90, quando si è scoperto che la citochina proinfiammatoria *Tumor Necrosis Factor-á* (TNF-á) è sintetizzata e rilasciata dagli adipociti; infatti la sua espressione è aumentata nell'obesità. Non a caso il TNF-á gioca un ruolo importante nell'induzione dell'insulinoresistenza e ha diversi effetti metabolici sul tessuto adiposo stesso, stimolando la lipolisi e l'apoptosi, come vedremo più avanti.

1.2 IL TESSUTO ADIPOSO COME ORGANO ENDOCRINO

Oltre ad essere un organo secretorio, il tessuto adiposo bianco è un organo endocrino a tutti gli effetti e di estrema importanza. Il cambiamento rivoluzionario nella prospettiva sul ruolo fisiologico del WAT risale al 1994, anno dell'identificazione dell'ormone *leptina*. Codificata dal gene *Ob*, che in forma mutata è

responsabile dell'obesità nei topi *Ob/Ob*, la leptina è una proteina di 16 kDa ,sintetizzata da numerosi tipi cellulari: stomaco, follicoli piliferi, ovaie, placenta e soprattutto adipociti. E' infatti il WAT il sito chiave per la produzione dell'ormone, quantitativamente. Dal punto di vista funzionale, la leptina fornisce un segnale ormonale chiave per l'ipotalamo nella regolazione dell'appetito e del dispendio energetico.

1.3 ADIPOCHINE, CITOCHINE E INFIAMMAZIONE

Dopo la scoperta di adiposina, TNF- α e leptina, si è visto che gli adipociti producono e secernono un vasto numero di molecole di natura proteica, collettivamente denominate "*adipocitochine*" o "*adipochine*". Quelle attualmente identificate sono più di 50 , ma la lista cresce di giorno in giorno. E comprende:

citochine: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, Transforming Growth Factor- β (TGF- β); *leptina*, *resistina*, *adiponectina*, *visfatina*; chemochine: IL-8, Monocyte Chemoattractive Protein-1 (MCP-1); proteine del sistema alternativo del complemento: *adiposina*; proteine emostatiche: Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1); proteine coinvolte nella regolazione della pressione arteriosa: angiotensinogeno; proteine angiogeniche : Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF); neurotrofine: Nerve Growth Factor (NGF); proteine di fase acuta: aptoglobina , Serum Amyloid-A (SAA); metallotionina.

Le adipochine costituiscono una classe di proteine estremamente eterogenea, sia in termini strutturali che funzionali. Ma presentano alcune caratteristiche comuni:

- Sono sempre prodotte ex-novo dalla trascrizione dei loro geni e non vengono mai accumulate nella cellula come molecole preformate.
- Agiscono su tipi cellulari diversi = *pleiotropismo*
- Possono avere effetti diversi sulla stessa cellula bersaglio , ovvero una può antagonizzare l'effetto di un'altra, dirette entrambe sulla stessa cellula.
- La loro attività è spesso ridondante, ovvero adipochine differenti possono svolgere la stessa azione biologica.
- La loro azione dipende dal legame a specifici recettori presenti sulle cellule bersaglio. Tali cellule possono essere:
 - le stesse che secernono l'adipochina = azione *autocrina*
 - cellule vicine o a breve distanza = azione *paracrina*
 - cellule lontane , attraverso il sangue =azione *endocrina*

Le adipochine, dunque, influenzano il comportamento delle cellule specifiche verso cui sono indirizzate, agendo da mediatori e/o da segnali intercellulari.

Dal punto di vista funzionale, le adipochine sono molecole polivalenti, coinvolte in un ampio numero di processi fisiologici e patologici. Infatti modulano la sensibilità dei tessuti periferici all'azione dell'insulina, ma regolano anche l'appetito, il dispendio energetico, il metabolismo glucidico e lipidico, l'emostasi, l'angiogenesi, la pressione arteriosa e tutto l'asse endocrino e riproduttivo. Inoltre molte appaiono fortemente correlate all'immunità e all'infiammazione, tanto che gli adipociti sono stati messi a

paragone con le cellule immunitarie; a conferma di ciò, si è visto che i preadipociti sono in grado di comportarsi come macrofagi e differenziarsi in essi, sotto determinate condizioni sperimentali (Cousin et al 1999; Cilena et al 2001).

Da questa vasta gamma di segnali e fattori proteici, è evidente come il WAT giochi un ruolo attivo nel controllare i processi fisiologici e patologici, in particolare il metabolismo e l'omeostasi energetica. E' infatti proprio attraverso le diverse adipochine che il tessuto adiposo comunica estensivamente con altri organi e sistemi metabolici, direttamente o indirettamente. Studi di co-coltura indicano che il WAT comunica direttamente con i tessuti periferici insulino-sensibili, in particolare con il muscolo scheletrico. E soprattutto c'è un intenso cross-talk tra adipociti bianchi e cervello, tramite la leptina e il sistema nervoso simpatico (Rayner et al 2001).

La leptina, una volta immessa nel torrente ematico, giunge al cervello, dove fornisce un segnale ormonale critico all'ipotalamo nella regolazione dell'appetito e del dispendio energetico. Infatti a livello ipotalamico interagisce con numerose vie oreoressigeniche e anoressigeniche, inibendo le prime e stimolando le seconde. Inibisce, cioè, i neuroni del nucleo arcuato che producono peptidi oreoressizzanti, ossia i principali effettori dello stimolo della fame: neuropeptide Y, agouti-related peptide, melanin concentrating hormone, orexina A. E contemporaneamente determina un'upregulation dei sistemi anoressizzanti: proopiomelanocortina/melanocortina, cocaine and amphetamine-regulated transcript e corticotrophin releasing hormone. Dunque il risultato finale è un'inibizione dell'appetito con conseguente riduzione del

food intake, cioè della quantità di cibo assunta. Inoltre la leptina aumenta il dispendio energetico tramite un incremento del tono del simpatico. La produzione di quest'ormone è strettamente correlata alla massa di tessuto adiposo e alla taglia degli adipociti. Infatti un aumento della massa grassa, in particolare del grasso viscerale, così come una dieta ad elevato contenuto calorico si associa a un aumento dei livelli circolanti di leptina, laddove un calo ponderale comporta una riduzione degli stessi. In aggiunta la leptina è sottoposta a un fine controllo ormonale: l'insulina e i glucocorticoidi ne stimolano sintesi e secrezione, mentre gli ormoni tiroidei insieme al sistema simpatico le inibiscono.

Oltre a questo suo ruolo chiave nel controllo del peso corporeo e del metabolismo, la leptina è un modulatore delle risposte immunitarie. E' infatti emerso che protegge le cellule timiche dall'apoptosi, stimola la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T, inducendone lo switch verso il fenotipo T helper1; influenza la produzione citochinica, incrementando la sintesi di IL-2. Inoltre stimola la proliferazione e l'attivazione dei monociti-macrofagi, favorendo così una risposta di tipo infiammatorio e inibendo al contrario le risposte anticorpo mediate, Th2 dipendenti. Un altro target della leptina è l'endotelio, dove favorisce lo stress ossidativo e aumenta l'espressione delle molecole di adesione. Dunque, complessivamente, la leptina è un immunomodulante con azione proinfiammatoria.

Anche il principale ormone di origine adipocitaria, l'adiponectina, svolge una potente azione antinfiammatoria (Ouchi et al 2000), oltre al suo ruolo nel modulare l'insulino-sensibilità e in molti altri processi metabolici (Yamauchi et al 2001).

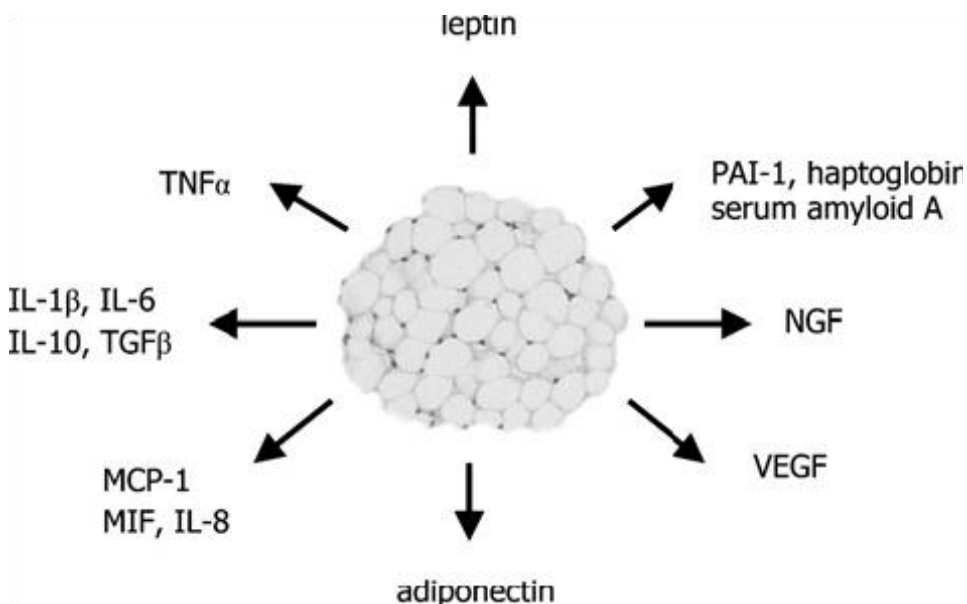


Figura 1.1 *Adipokine correlate all'infiammazione e alla risposta immunitaria*
(Biochemical Society Transactions (2005) Volume 33, part 5, 1079)

Fanno parte del gruppo delle citochine infiammatorie il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'interleuchina-1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6), che costituiscono la cosiddetta triade infiammatoria, insieme alle chemochine ed ad altre citochine. Sono prodotte da molte cellule, tra cui macrofagi, neutrofilii e cellule endoteliali. Queste citochine sembrano essere tra i maggiori regolatori del metabolismo del tessuto adiposo: gli adipociti, infatti, sintetizzano le citochine infiammatorie e quindi hanno un ruolo importante nella regolazione della composizione corporea e nella patogenesi pro-infiammatoria.

Il TNF- α , prodotto principalmente dai monociti/macrofagi attivati e in misura minore dalle cellule NK, mastociti e linfociti T attivati, è la prima citochina ad essere rilasciata in seguito ad un'infezione da batteri gram-negativi (LPS), virus e durante un'inflammatione acuta. Infatti, il TNF- α , insieme all'IL-1 ed all' IL-6, sono definiti "citochine infiammatorie". Localmente, la sua azione biologica è indispensabile per la risoluzione di un'infezione e/o di una reazione infiammatoria, mentre, quando è prodotta in quantità maggiori, può causare danni a livello sistemico, come la sindrome da shock settico, la cachessia, la necrosi emorragica dei tessuti, e contribuire alla patogenesi di alcune malattie autoimmuni. Quando è prodotto localmente le sue principali attività biologiche consistono nel :

- favorire il reclutamento dei neutrofili e dei monociti nei focolai d'infezione, inducendo l'espressione delle molecole d'adesione (CAM) sulle cellule endoteliali;
- attivare le loro funzioni microbicide dei macrofagi e dei neutrofili;
- stimolare la produzione di IL-1, IL-6 e chemochine;
- indurre la febbre (pirogeno endogeno);
- aumentare da parte degli epatociti la sintesi delle proteine della fase acuta.

In casi d'infezione molto gravi, il TNF- α è prodotto in quantità elevate, che possono provocare nell'organismo alcune alterazioni patologiche sistemiche, quali:

- un danno al tessuto muscolare ed adiposo, detto "cachessia", caratterizzato da un evidente deperimento fisico;

- inibizione della contrattilità del miocardio, che determina la caduta della pressione arteriosa e possibile shock;
- formazione di trombi intravascolari, stimolando le cellule endoteliali a produrre un attivatore della coagulazione

Nei soggetti obesi è stato osservato un aumento dei livelli sierici di TNF- α .

Quattro diversi peptidi compongono la famiglia dell'IL1 (IL-1 α ed IL-1 β che hanno attività biologiche affini, IL-1 ρ che è l'antagonista del recettore dell'IL-1 ed IL-18). Le cellule presentanti l'antigene ed anche le cellule epiteliali possono essere una fonte di IL-1. La più importante attività biologica dell'IL-1 consiste nell'attivazione dei linfociti T che si attua attraverso l'aumentata produzione di IL-2 e l'espressione del suo recettore (CD25). Pertanto, in assenza di IL-1 si può determinare un deficit della risposta immune o sviluppare uno stato di tolleranza immunologica. L'IL-1 determina inoltre un aumento della proliferazione dei linfociti B e genera un incremento della sintesi anticorpale. Il rilascio di IL-1, interagendo con il SNC, può determinare la comparsa di una serie di sintomi costituzionali: febbre, anoressia, sonnolenza fino allo stato letargico. A livello epatico l'IL-1 favorisce la sintesi delle proteine della fase acuta (proteina C-reattiva, complemento, amiloide, ecc). Inoltre, contribuisce a causare ipotensione in corso di shock settico. A livello endoteliale determina l'espressione di molecole d'adesione (quali ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectina). La IL-1 β inibisce il differenziamento degli adipociti, l'espressione ed attività della lipoproteina lipasi. Stimola la lipolisi ed inibisce la lipogenesi inibendo l'espressione delle proteine di trasporto degli acidi grassi ed una traslocasi nel tessuto adiposo. Le

concentrazioni seriche dell'antagonista del recettore per IL-1 (IL-1ra) aumentano in caso di obesità e diminuiscono dopo perdita di peso conseguente a by-pass chirurgico.

L'IL-6 è una citochina pleiotropica la cui produzione ed il cui spettro di attività sono strettamente correlati a quelli dell'IL-1 e del TNF- α . Una gran varietà di tipi cellulari possono produrre l'IL-6, quando appropriatamente stimolati, fra cui monociti-macrofagi, linfociti T e B, cellule endoteliali, cellule muscolari vasali e mesangiali, fibroblasti. La produzione è indotta da stimoli infiammatori, in particolare prodotti batterici (endotossine) e citochine quali l'IL-1 e il TNF- α , ed esercita effetti tossici sull'endotelio vascolare, cartilagine, osso, muscolo ed altri tessuti. Una volta che il processo pro-infiammatorio è iniziato, potrebbe avvenire un prolungamento del deterioramento patofisiologico. A causa degli effetti della citochina nelle diverse regioni del corpo, manifestazioni cliniche e malattie diverse possono rappresentare una comune e consistente entità che non è separabile dalle sue implicazioni molecolari: da questo punto di vista, l'infiammazione può rappresentare un comune denominatore. Tuttavia, le reazioni infiammatorie non dipendono da un singolo mediatore, ma un insieme di citochine è cruciale per la perpetuazione della risposta di fase acuta e nello stesso tempo esiste un meccanismo di feedback che mantiene il bilanciamento infiammatorio, agendo come un network nello stimolare la produzione di proteine di fase acuta. Ad esempio, gli effetti di IL-6 sulla proteina C reattiva (CRP), correlata alle malattie cardiovascolari, dipendono in gran misura dall'interazione con IL-1 β , e l'espressione dell'antagonista del recettore dell' IL-1 è

rapidamente indotto da IL-6. Ci sono alcune evidenze che queste citochine siano implicate nello sviluppo di disordini metabolici. In particolare un aumento dei livelli di IL-1 e IL-6 incrementa il rischio di sviluppo di diabete di tipo 2, avvalorando l'ipotesi che una reazione infiammatoria subclinica abbia un ruolo nella patogenesi di questa malattia.

Inoltre, l'IL-6 insieme al TNF- α e all'IL-1, possiede diversi effetti pleiotropici su diversi processi metabolici, tra cui la regolazione della lipoproteina lipasi degli adipociti.

IL-6 è prodotta durante la risposta immune e regola la proliferazione e differenziazione di linfociti T e B. L'effetto proliferativo su cellule B ha rilevanza fisiopatologica in alcune patologie neoplastiche o paraneoplastiche che interessano questo stipite cellulare.

1.4 INFIAMMAZIONE E OBESITA'

Come hanno rivelato numerosi studi, l'espressione, la produzione e il rilascio di un gran numero di queste adipochine infiammazione-correlate è aumentata nel tessuto adiposo dei soggetti obesi. In particolare, IL-1, IL-6 e TNF- α mostrano una espressione genica a livello del tessuto adiposo e livelli plasmatici significativamente elevati nei soggetti sovrappeso e ancor di più obesi. Allo stesso modo l'eccesso di adiposità si associa a un'upregulation delle proteine di fase acuta, proteine normalmente sintetizzate dagli epatociti in risposta a danno tissutale e/o infezioni, che includono: proteina C-reattiva (CRP), SSA, aptoglobina, fibrinogeno e PAI-1, e i

cui livelli circolanti sono incrementati proprio nei soggetti peobesi-obesi. Soprattutto i livelli sierici di CRP risultano positivamente correlati con gli indici di obesità e insulinoresistenza. Un'eccezione a questo pattern di iperproduzione è rappresentata dall'adiponectina; la espressione genica nel tessuto adiposo e i livelli circolanti di adiponectina sono, infatti, significativamente ridotti nell'obesità (Arita et al,1999; Engeli et al, 2003), ma anche nell'insulinoresistenza, nel diabete di tipo II (Hotta et al,2000; Hotta et al,2001), nella dislipidemia (Matsubara et al,2002) e nei soggetti con coronaropatia (Zoccali et al,2002). Al contrario, un calo ponderale aumenta la concentrazione plasmatica di adiponectina (Yang et al,2001), così come il trattamento farmacologico dell'insulinoresistenza tramite tiazolidinici (Maeda et al,2001; Yang et al,2002). I ridotti livelli di adiponectina circolante, insieme ai livelli particolarmente elevati delle altre adipochine, che caratterizzano i soggetti obesi, riflettono un'alterazione dell'espressione genica di queste molecole a livello del tessuto adiposo e quindi, in ultima analisi, una disregolazione o un malfunzionamento degli adipociti (Hu et al,1996; Statnick et al,2000; Engeli et al,2003).

Date queste premesse, se noi consideriamo l'azione antinfiammatoria dell'adiponectina e la relazione inversa tra i ridotti livelli plasmatici di quest'ormone e gli aumentati livelli dei mediatori della infiammazione hs-CRP, IL-6 e TNF- α , nei soggetti obesi (Engeli et al,2003), entrambi i dati esacerbano l'ipotesi che il tessuto adiposo si trovi in uno stato di "infiammazione" nell'obesità.

Infatti una delle più importanti chiavi di sviluppo nello studio dell'obesità negli ultimi cinque anni, è stato il recente riconoscimento che la sindrome è caratterizzata da un'inflammatione cronica di basso grado (Yudkin et al,1999; Festa et al,2001; Engstrom et al,2003). La principale base per questa visione è che i livelli circolanti di molti markers dell'inflammatione, quali IL-6, TNF- α , IL-18, MIF, CRP, PAI-1, aptoglobina, SSA, sono elevati nei soggetti obesi e alcuni, quali CRP, IL-6 e IL-18 si riducono in seguito a calo ponderale.

Queste osservazioni suggeriscono che l'adiposità è la causa fondamentale dell'inflammatione sistemica osservata nell'obeso. Dato che il WAT esprime e secerne un ampio numero di adipochine correlate all'inflammatione, si ritiene che esso stesso sia la fonte principale dell'incremento dei markers infiammatori nell'obesità. Tuttavia è difficile documentare l'importanza quantitativa del tessuto adiposo. Ciò che ormai è noto è che il tessuto adiposo viscerale (Visceral Adipose Tissue, VAT) è la fonte preminente degli elevati livelli di citochine circolanti, rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo (Subcutaneous Adipose Tissue, SAT). Non si conoscono ancora le cause che sottendono le differenze metaboliche tra i due tessuti, ma è probabile che l'accesso diretto alla circolazione portale da parte dei prodotti del VAT, ma non del SAT, possa spiegarne gran parte (Park et al,2005).

Ad ogni modo, oggi la comunità scientifica è concorde nel ritenere che le adipochine e tutti gli altri fattori prodotti e rilasciati dal WAT, siano i diretti responsabili dello stato di inflammatione cronica di basso grado che connota l'obesità, soprattutto quella viscerale.

Per capire il legame causale tra l'obesità e questa infiammazione generalizzata, dobbiamo analizzare cosa accade nel tessuto adiposo di un soggetto obeso. Un recente studio di Chen (2006) ha proposto un modello ipotetico che spiega la relazione tra obesità, risposte cellulari infiammatorie e insulinoresistenza. Secondo tale modello, l'iperalimentazione e quindi l'eccessivo introito di alimenti nel tessuto adiposo, porta a un'espansione del tessuto adiposo stesso con un'aumentata secrezione di acidi grassi liberi (FFAs) e adipochine proinfiammatorie da parte degli adipociti, quali leptina, resistina, IL-6 e MCP-1. Quest'ultimo, MCP-1 ed altre molecole chemotattiche stimolano il reclutamento dei monociti circolanti nel tessuto adiposo ed M-CSF ne induce la trasformazione in macrofagi. Il risultato è l'attivazione dei macrofagi in sede, che risulta in un'aumentata secrezione di chemochine e citochine, in particolare TNF- α e IL-6, le quali a loro volta inducono insulinoresistenza negli adipociti.

A conferma di questo modello, è emerso che il WAT degli individui obesi è contraddistinto da una spiccata infiltrazione di macrofagi (Weisberg et al,2003; Xu et al,2003). I macrofagi sono normali componenti cellulari del WAT e il loro numero è direttamente correlato con il numero e la taglia degli adipociti. Dunque il tessuto adiposo nel soggetto obeso contiene un numero aumentato di macrofagi, che risultano attivati sia morfologicamente, formando cellule giganti multinucleate, segno di infiammazione cronica, sia funzionalmente, costituendo la principale fonte del TNF- α prodotto dal WAT e contribuendo approssimativamente al 50% dell'IL-6 WAT derivata (Weisberg et al,2003; Xu et al,2003). Il TNF- α rilasciato, agisce solo

localmente inibendo il segnale insulinico; inibisce, infatti, la fosforilazione della tirosinasi del recettore insulinico, inducendo così un difetto del signalling insulinico e in ultima analisi insulinoresistenza. Inoltre, TNF- α attiva la trascrizione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B, che orchestra una serie di modificazioni infiammatorie nella parete vasale: stimola l'espressione delle molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e sulle cellule muscolari lisce vascolari, tra cui ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecole-1) e VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecole-1), che inducono l'adesione dei monociti circolanti alla parete vasale; MCP-1 ed M-CSF, che inducono la diapedesi dei monociti nei vasi e la conversione in macrofagi attivati. Accanto al TNF- α , l'IL-6 prodotta dagli adipociti e dai macrofagi residenti, viene rilasciata in circolo e svolge un'importante attività antinfiammatoria sia per se stessa, stimolando la sintesi epatica di CRP (Castell et al,1990), che attraverso l'incremento dei livelli circolanti di IL-1 e TNF- α . I livelli sierici di CRP, misurati tramite un saggio ad alta sensibilità (hs-CRP), sono divenuti un marker importante di infiammazione vascolare e aterosclerosi (Ridker et al,2000; Ridker et al,2001; Hashimoto et al,2001; Van Der Meer et al,2002). Gli studi più recenti indicano che hs-CRP è un importantissimo predittore di aterosclerosi, esattamente come i valori di LDL-Colesterolo circolante (Ridker et al,2002). Questi dati suggeriscono che l'infiammazione ha potenzialmente lo stesso peso del colesterolo nel contributo al processo aterosclerotico. Ancora, l'IL-6 stimola la produzione epatica di glucosio e la sintesi delle VLDL e riduce i livelli di adiponectina. Adiponectina, che al contrario, esercita una spiccata azione antinfiammatoria e insulinosensibilizzante. Riduce infatti

la produzione epatica di glucosio, inibendo l'espressione degli enzimi di gluconeogenesi epatica, incrementa il trasporto di glucosio nel muscolo scheletrico e l'ossidazione degli acidi grassi, così come aumenta l'uptake di glucosio nelle cellule adipose, il tutto attraverso l'attivazione di un'AMP chinasi. Inoltre l'adiponectina inibisce molti step del processo infiammatorio e sembra avere un ruolo protettivo dal punto di vista metabolico. In vitro, infatti, sopprime l'NF- κ (Ouchi et al,2000), riducendo l'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali (Ouchi et al,1999) e sopprime la funzione macrofagica (Yokota et al,2000; Ouchi et al,2001). In vivo, aderisce alle lesioni endoteliali (Okamoto et al,2000), previene la neoformazione intimale (Matsuda et al,2002) e previene l'aterosclerosi nei topi (Okamoto et al,2002). Dunque, complessivamente, l'adiponectina ha un'azione antinfiammatoria, ma anche antiossidante, antiaggregante e profibrinolitica. A sostegno di ciò, i livelli di questo ormone risultano caratteristicamente bassi nell'obesità, nel diabete tipo II e nelle coronaropatie. In aggiunta, dobbiamo considerare il ruolo nell'obesità dei FFA, che come già detto, aumentano in funzione della massa di tessuto adiposo. Questi, una volta in circolo, vanno a stimolare a livello epatico la gluconeogenesi e la sintesi di trigliceridi e VLDL; a livello muscolare, inibiscono il trasporto intracellulare di glucosio insulinomediato e aumentano i lipidi intracellulari; a livello delle insule pancreatiche, l'accumulo di FFA riduce la secrezione insulinica, favorendo così l'insorgenza di ridotta tolleranza glucidica. Il risultato finale è l'insulinoresistenza.

Un'ulteriore teoria che tenta di motivare lo stato infiammatorio del WAT nell'obesità, ne identifica l'origine e la causa nell'ipossia (Trayhurn et al,2004). La progressiva espansione del WAT renderebbe i gruppi di adipociti più distanti dalla vascolatura e relativamente poveri di ossigeno. Come è noto, l'ipossia stimola la produzione e il rilascio di citochine infiammatorie, chemochine e fattori angiogenetici, che aumentano l'apporto ematico tissutale. Questo modello presenta molte similitudini con le risposte metaboliche che si attivano nel processo di guarigione delle ferite e nei tumori solidi, e che comportano sempre il reclutamento del fattore di trascrizione "Hypoxia Inducible Factor-1" (HIF-1), attualmente ritenuto il sensore molecolare della bassa tensione di ossigeno (Semenza et al,2001; Wenger et al,2002).

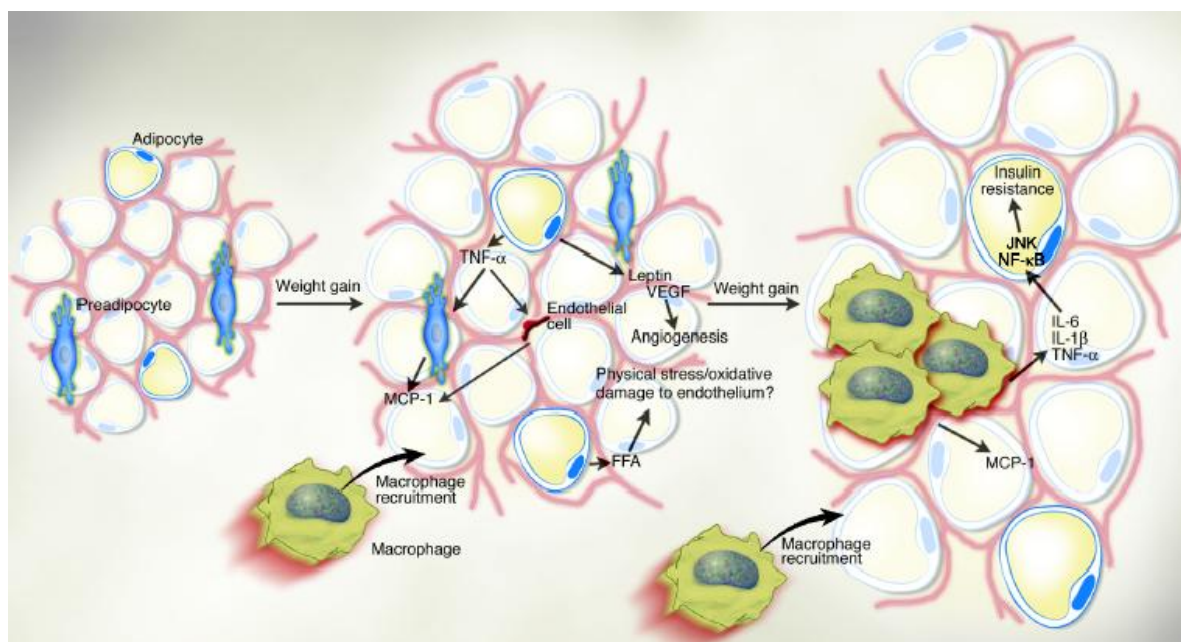


Figura 1.2 Reclutamento dei monociti/macrofagi da parte del tessuto adiposo (WAT).

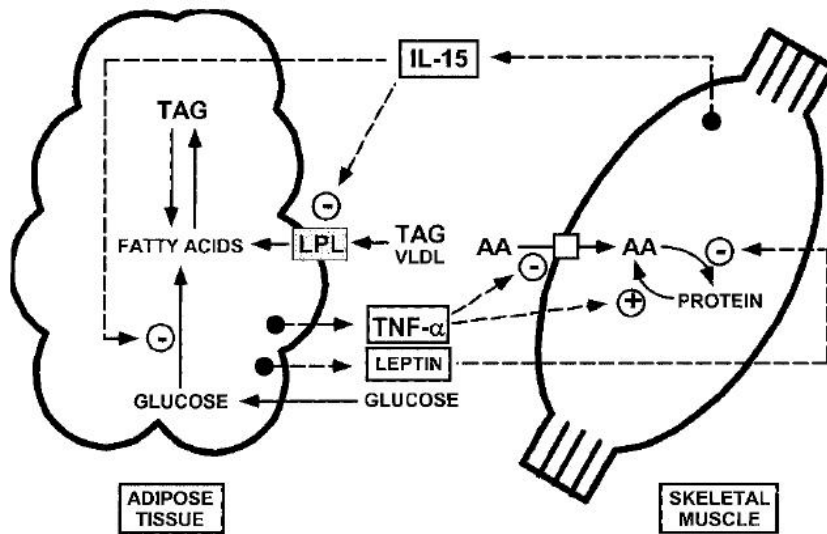


Figura 1.3 Modello che propone la regolazione reciproca tra tessuto adiposo e tessuto muscolare

1.5 POLIMORFISMI DEI GENI DELLE CITOCHINE

Le variazioni genetiche inter-individuali rappresentano un determinante critico nelle differenze tra individuo ed individuo. La variabilità genetica più comune è causata principalmente dal polimorfismo di un singolo nucleotide ovvero dalla sostituzione di una singola base nella sequenza del DNA, avvenendo ogni 1000-2000 nucleotidi nel genoma umano. Il polimorfismo rappresenta il risultato di una predisposizione o di un' influenza dell' ambiente, o di una combinazione dei due eventi, in altri termini è alla base delle variazioni osservate in tutte le forme di vita anche all'interno di un singolo individuo. Se il meccanismo di questi polimorfismi coinvolti

nell'infiammazione potesse essere chiarito, sarebbe possibile sviluppare strategie e terapie dietetiche per correggere i rischi individuali di sviluppo di malattie.

Iperensione, dislipidemie, diabete mellito di tipo 2 ed obesità si ritrovano spesso nella stessa persona. Ad esempio, concentrazioni elevate di IL-6 si ritrovano nel plasma di soggetti obesi ed il polimorfismo 174 G-C a monte del sito di inizio della trascrizione del gene di IL-6 è stato associato alla sensibilità all' insulina ed ai livelli di trigliceridi plasmatici. Il polimorfismo 174 G-C all'interno della 5' flanking region del gene dell' IL-6 influenza il livello della quota di trascrizione del gene stesso. Il polimorfismo del gene dell' IL-6 è stato studiato in relazione al rischio di malattie coronariche ed ipertensione. E' stato dimostrato che l'allele C è associato con più bassi livelli plasmatici dell'IL-6, suggerendo una differenza determinata geneticamente nel grado di risposta dell'IL-6 agli stimoli stressanti tra gli individui. E' stato descritto che il genotipo 174 C-C presenta anomalie lipidiche, aumento del rischio di insulinoresistenza e diabete di tipo 2. Recentemente è stato riportato che l'allele 174 G è più comune tra gli uomini magri in associazione con concentrazioni plasmatiche di insulina e glucosio più basse dopo un test di tolleranza orale al glucosio. Secondo questi risultati, la variazione del gene IL-6 risulta in una modulazione metabolica, con un importante ruolo nell'eziologia delle malattie cardiovascolari e diabete di tipo 2.

Grandi benefici potrebbero essere ottenuti con semplici ma corrette modifiche delle abitudini alimentari, per rallentare o bloccare la malattia al suo primo insorgere. La genomica nutrizionale, quindi, permette di sviluppare biomarkers per individuare

cambiamenti precoci dello stato di salute. Sono possibili due strategie per esplorare questo campo. La prima parte dalle condizioni di malattia ed esamina gli effetti dei componenti della dieta sui pattern di espressione dei geni senza pregiudizi od aspettative. Il secondo approccio è focalizzato, al contrario, sullo stato di malattia e sulla identificazione dei primi geni coinvolti nel meccanismo di sviluppo della malattia stessa. Di fondamentale importanza, quindi, risolvere il ruolo delle interazioni gene-gene e gene-ambiente nelle malattie poligeniche. Questi geni potrebbero essere usati come target per identificare agenti nutrizionali in grado di modulare la loro espressione.

1.6 OBESITA': RISCHIO CARDIOVASCOLARE E DIABETE TIPO II

Il mondo scientifico è concorde nel ritenere che lo stato infiammatorio cronico che caratterizza l'obesità e in particolare l'iperproduzione di citochine proinfiammatorie, ha un ruolo centrale, dal punto di vista eziologico, nello sviluppo delle patologie correlate all'obesità (Yudkin et al,2003; Hotamisligil,2003). L'infiammazione predispone, cioè, allo sviluppo di insulinoresistenza, diabete mellito di tipo II e aterosclerosi, quindi patologie cardiovascolari (CardioVascular Disease,CVD), così come agli altri componenti della sindrome metabolica (Figura 2a). Questo coincide con il crescente riconoscimento dell'importanza dell'infiammazione, quale elemento chiave in una vasta gamma di patologie, comprese quelle legate all'invecchiamento, ad esempio le demenze (Krabbe et al,2004). Oggi sappiamo che è soprattutto l'adiposità viscerale, non il solo aumento di adiposità totale, che si associa ad un

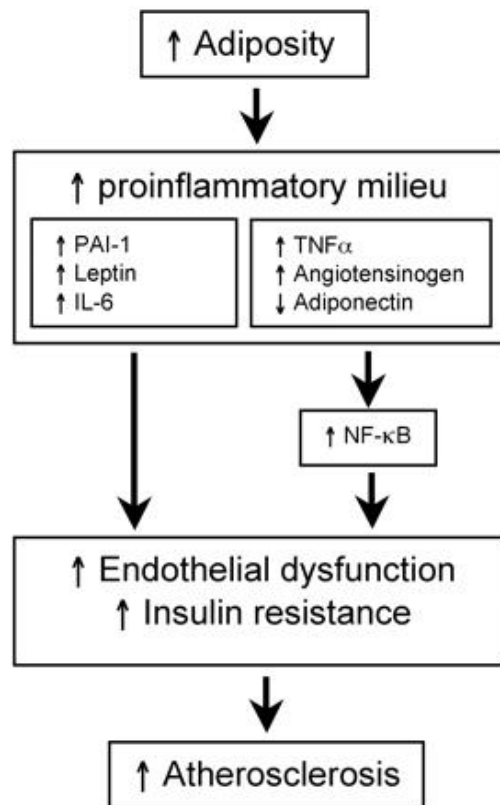


Figura 1.4 Legame tra obesità e rischio di CVD e DMII.
(*Endocrinology*,2003,144(6):2195-2200)

aumentato rischio di CVD e diabete di tipo II, poiché rappresenta la fonte primaria delle adipochine proinfiammatorie, come precedentemente esposto. Proprio queste adipochine sono direttamente coinvolte nello sviluppo dell'insulinoresistenza, così come giocano un ruolo importante nel processo aterosclerotico (Figura 2b). Diversi studi prospettici hanno mostrato, infatti, che i livelli plasmatici di molti mediatori

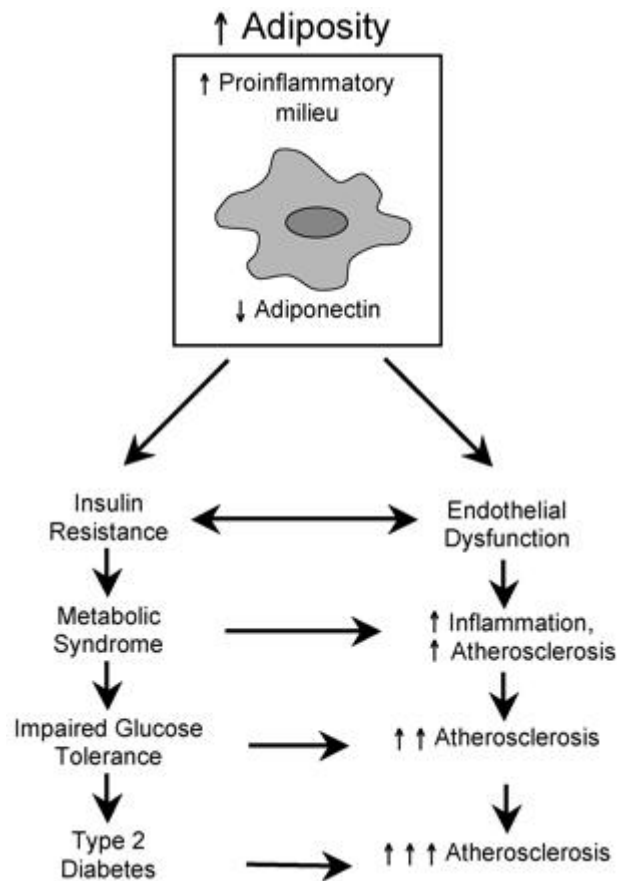


Figura 1.5 Obesità e rischio di CVD e DMII
(*Endocrinology* 2003,144(6):2195-2200)

dell'infiammazione sono predittivi del rischio di insorgenza di diabete di tipo II ed eventi cardiovascolari. Tuttavia è necessario ancora molto lavoro per comprendere al meglio i meccanismi alla base del legame tra obesità viscerale e incrementato rischio metabolico.

Molte delle adipochine proinfiammatorie la cui espressione risulta alterata nell'obesità promuovono un ambiente infiammatorio e inducono insulinoresistenza, disfunzione endoteliale e infine aterosclerosi.

L'obesità promuove la progressione parallela di insulinoresistenza, diabete di tipo II e disfunzione endoteliale verso l'aterosclerosi.

CAPITOLO 2

DISORDINI METABOLICI

Come precedentemente esposto, l'obesità rappresenta un fattore di rischio indipendente per le patologie cardiovascolari e recentemente è stata associata al precoce sviluppo di aterosclerosi coronarica negli adolescenti e nei giovani adulti.

Nella determinazione del sovrappeso e dell'obesità rivestono particolare importanza la valutazione della distribuzione dei componenti della massa corporea , nonché la valutazione dei fattori di rischio indipendenti eventualmente associati, quali diabete di tipo 2, dislipidemia, ridotta tolleranza glucidica, ecc.

La distribuzione del grasso corporeo ha un ruolo paragonabile al profilo lipidico e glucidico nel predire morbilità e mortalità cardiovascolare. E' stato riportato, infatti, che il rischio di coronaropatia correla positivamente con il grado di obesità, soprattutto con quella a livello addominale.

L'obesità centrale rappresenta inoltre il principale fattore di rischio per lo sviluppo della *sindrome metabolica*, definita come associazione di molteplici fattori di rischio per patologia cardiovascolare, quali dislipidemia, ipertensione, intolleranza glicidica ed iperinsulinemia.

Tuttavia è interessante notare come non tutti gli individui obesi mostrano un profilo di rischio metabolico e cardiovascolare, sottolineando l'eterogeneità di questa patologia che riconosce numerose possibili eziologie.

Fin dagli anni 80', infatti, numerosi ricercatori hanno cominciato a identificare l'esistenza di differenti sottotipi di obesità, riconoscendone inizialmente due: individui obesi ma metabolicamente sani, denominati *metabolically healthy, but obese (MHO)* e individui di peso normale ma metabolicamente obesi, ossia *metabolically obese, but normal weight (MONW)*. A questi due gruppi è stata aggiunta di recente una nuova sindrome chiamata "Normal Weight Obese Syndrome" (NWO) o "Sindrome De Lorenzo", caratterizzata da un peso normale, una massa grassa >30% ed assenza di sindrome metabolica.

2.1 SINDROME METABOLICA

Molti sono stati i criteri adottati nel tempo per definire la sindrome metabolica, prima di giungere a una definizione univoca e universale.

Tra questi, quelli universalmente accettati sono stati prima quelli elaborati dalla World Health Organization (WHO) nel 1999 (Tabella 1), successivamente quelli proposti dal National Cholesterol Education Program Third Adult Treatment Panel (NCEP ATP III) nel 2001 (Tabella 2).

Table 1: WHO clinical criteria for the metabolic syndrome*

In order to make a diagnosis of the metabolic syndrome a patient must present with glucose intolerance, impaired glucose tolerance (IGT) or diabetes and/or insulin resistance, together with two or more of the following components:

- Impaired glucose regulation or diabetes
- Insulin resistance (under hyperinsulinaemic euglycaemic conditions, glucose uptake below lowest quartile for background population under investigation)
- Raised arterial pressure $\geq 140/90$ mm Hg
- Raised plasma triglycerides (≥ 1.7 mmol/L; 150 mg/dL) and/or low HDL cholesterol (< 0.9 mmol/L, 35 mg/dL men; < 1.0 mmol/L, 39 mg/dL women)
- Central obesity (males: waist to hip ratio > 0.90 ; females: waist to hip ratio > 0.85) and/or BMI > 30 kg/m²
- Microalbuminuria (urinary albumin excretion rate ≥ 20 g/min or albumin:creatinine ratio ≥ 30 mg/g)

Report of a WHO consultation 1999

Table 2: ATP III clinical identification of the metabolic syndrome⁵

Three or more of the following five risk factors:	
Risk factor	Defining level
Central obesity <ul style="list-style-type: none"> • Men • Women 	Waist circumference > 102 cm (> 40 in) > 88 cm (> 35 in)
Triglycerides	≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L)
HDL cholesterol <ul style="list-style-type: none"> • Men • Women 	< 40 mg/dL (1.03 mmol/L) < 50 mg/dL (1.29 mmol/L)
Blood pressure	$\geq 130/ \geq 85$ mm Hg
Fasting glucose	≥ 110 mg/dL (6.1 mmol/L)

Expert Panel, Jama2001;285: 2486-2497

Come è evidente , queste due classificazioni presentano importanti differenze oggettive, non fornendo criteri esatti per identificare gli individui con sindrome metabolica nella pratica clinica. Questo peraltro ha reso difficile mettere a confronto diretto i dati provenienti dai diversi studi che abbiano utilizzato parametri differenti per definire la sindrome.

Da qui la assoluta necessità di creare una definizione unica, universalmente valida, che fornisca un valido strumento diagnostico, facile da usare nella pratica clinica e non solo nel settore della ricerca, a livello mondiale, per una precoce identificazione della sindrome. Sindrome, la cui prevalenza è in continuo aumento e che si associa ad un rischio considerevolmente aumentato di sviluppare patologie cardiovascolari e/o diabete di tipo 2.

Nel 2005 l'International Diabetes Federation(IDF), riunendo i massimi esperti mondiali in materia, ha coniato una nuova definizione universale di sindrome metabolica(Tabella 3), unificando le principali classificazioni preesistenti.

Tabella 3: The New International Diabetes Federation (IDF) definition

According to the new IDF definition, for a person to be defined as having the metabolic syndrome they must have:

Central obesity (defined as waist circumference \geq 94cm for European men and \geq 80cm for European women, with ethnicity specific values for other groups)

plus any two of the following four factors:

- **raised TG level:** \geq 150 mg/dL (1.7 mmol/L), or **specific treatment for this lipid abnormality**
- **reduced HDL cholesterol:** $<$ 40 mg/dL (1.0 mmol/L) in males and $<$ 50 mg/dL (1.3 mmol/L) in females, or **specific treatment for this lipid abnormality**
- **raised blood pressure:** systolic BP \geq 130 or diastolic BP \geq 85 mm Hg, or **treatment of previously diagnosed hypertension**
- **raised fasting plasma glucose (FPG)** \geq 100 mg/dL (5.6 mmol/L), or **previously diagnosed type 2 diabetes**
If above 5.6 mmol/L or 100 mg/dL, OGTT is strongly recommended but is not necessary to define presence of the syndrome.

Questa nuova definizione pone l'accento sull'*obesità centrale*, definita come una circonferenza vita superiore o uguale a 94 cm negli uomini e 80 cm nelle donne, per la razza caucasica, con valori diversi in base al gruppo etnico e al sesso. L'obesità centrale è ritenuta un criterio imprescindibile per fare diagnosi, insieme alla presenza di almeno due dei seguenti fattori di rischio cardiovascolari: trigliceridemia \geq 150 mg/dl, colesterolo HDL $<$ 40 mg/dl negli uomini e $<$ 50 mg/dl nelle donne, pressione arteriosa \geq 130/85 mmHg e glicemia a digiuno \geq 100 mg/dl.

L'importanza della sindrome metabolica è nell'essere un predittore di aumentata morbilità e mortalità cardiovascolare ed elevato rischio di diabete tipo II. Infatti triplica il rischio di infarto miocardico o ictus, raddoppia la mortalità per patologie

cardiovascolari ed aumenta di 5 volte il rischio di sviluppare diabete di tipo II rispetto alla popolazione generale.

Le componenti prevalenti della sindrome sono: l'obesità viscerale (39% della popolazione adulta americana: 30% degli uomini e 46% delle donne); il basso HDL-C (37% degli adulti: 35% degli uomini e 39% delle donne) e l'ipertensione arteriosa (34% degli adulti: 38% degli uomini e 29% delle donne). L'ipertrigliceridemia è presente nel 30% della popolazione adulta: rispettivamente 35% degli uomini e 24% delle donne.

In totale, tra il 1988-94, in base ai dati provenienti dal National Health And Nutrition Examination Survey III (NHANES 1988-1994) (Ford et al. 2002), la prevalenza della sindrome metabolica, definita con i criteri dell'ATPIII, nella popolazione americana adulta era intorno al 24% (quasi 1 su 4 adulti). In realtà, considerando il costante incremento della prevalenza dell'obesità negli Stati Uniti ed in genere nel mondo occidentale (WHO 1997, 2003; James 2001), si calcola che la prevalenza della sindrome sia ulteriormente aumentata, e rappresenti oggi non meno del 30-35% della popolazione adulta, utilizzando la definizione NCEP-ATPIII, mentre basandosi sui criteri dell'IDF la prevalenza sale al 39% circa (NHANES 1999-2002) (Ford et al. 2005). L'applicazione dei risultati di questa indagine alla popolazione attuale degli Stati Uniti, indica che circa 47 milioni di persone negli USA sono attualmente affette da sindrome metabolica. È chiaro che la sindrome rappresenta una delle tre patologie a più elevata prevalenza nell'uomo, ma anche tra le più costose in termini

di morbilità e mortalità, considerando i costi sanitari associati alle sue conseguenze, cioè diabete e malattie cardiovascolari aterosclerotiche.

La prevalenza aumenta proporzionalmente alla classe d'età, colpendo circa il 43% delle persone tra i 60 e i 69 anni. Ma è allarmante soprattutto che sia dimostrato un incremento nella popolazione giovanile tra i 12 e i 19 anni (WHO 1997, 2003, D'Amicis et al 2002, Cole et al 2000, INRAN 2003), e probabilmente il 4% degli adolescenti e circa il 30% degli adolescenti obesi negli USA (o in totale 910.000 adolescenti) soddisfano i criteri diagnostici dell'ATP III (Cook et al., 2003).

L'eziologia della sindrome non è stata ancora definita. Inizialmente si riteneva che la causa scatenante fosse l'insulinoresistenza (Reaven 1988), ma si tratta di una caratteristica che, se pur presente in molti pazienti affetti da sindrome metabolica e di gravità crescente in maniera direttamente proporzionale al numero di fattori di rischio presentati dal paziente, non rende conto di tutti i casi: il 45,3% dei pazienti con sindrome metabolica ha una resistenza all'insulina, il che vuol dire che oltre il 50% non ce l'ha, e il 33% dei pazienti non insulino-resistenti presenta una sindrome metabolica.

Oggi si ritiene che lo sviluppo della sindrome sia dovuto all'interazione tra fattori genetici, per definizione non modificabili, con elementi ambientali, quindi potenzialmente modificabili. Esiste cioè una predisposizione ereditaria o acquisita (fattori intrinseci) che sarebbe espressa in presenza di fattori esterni legati allo stile di vita (quali obesità, sedentarietà e abitudini nutrizionali). (Di Blasio 2002, Cavagnini 2002, Nisoli 2002).

Molti studi epidemiologici hanno dimostrato che esiste una componente ereditaria, probabilmente di tipo autosomico dominante, ma a tutt'oggi non è stato individuato il gene o il gruppi di geni responsabili (Di Blasio 2002, Ukkola 2000, 2001; Bouchard 1990, 1995). È stata avanzata l'ipotesi di un "thrifty genotype" ("parco genotipo").

Studi epidemiologici hanno rilevato una stretta relazione inversa tra il peso alla nascita e il rischio di sviluppo di sindrome metabolica e diabete tipo II. La prova dell'importanza dei fattori legati a ritardi nella crescita intrauterina e/o nelle fasi successive alla nascita su base nutrizionale (mancanza di proteine) è stata ottenuta da esperimenti su topi, in cui si dimostra un'alterazione permanente del metabolismo associata alla scarsa capacità di secrezione d'insulina e insulino-resistenza (permanente cambiamento di alcuni enzimi coinvolti in processi di gliconeogenesi, viene così proposta un'ipotesi di "thrifty phenotype" ("parco fenotipo"), predisposizione costituzionale non genetica (dal periodo intrauterino o prima infanzia) alla sindrome metabolica, che può essere espressa in condizioni di eccesso calorico, obesità e sedentarietà.

Recentemente è stata proposta un'ipotesi sul ruolo dell'aumento di attività d'asse HPA (Ipotalamo-Ipofisi-Surreni) e glicocorticoidi. Non è ancora confermata la responsabilità dell'aumentata attivazione tissutale di cortisolo, geneticamente determinata o acquisita ("programmazione intrauterina") (Pasquali e Vicennati 2000, Cavagnini 2002).

Nonostante sia indiscutibile il ruolo della predisposizione individuale, il progressivo aumento della prevalenza di obesità e diabete di tipo II, porta a supporre che

particolari stili di vita (la sedentarietà, una dieta ipercalorica, ricca di grassi saturi e conseguente obesità, lo stress), potenzialmente modificabili, possano modulare l'azione dell'insulina. Abitudini alimentari ed esercizio fisico, sono una parte integrante dello stile di vita che può essere modificata per migliorare alterazioni metaboliche quali insulinoresistenza, prevenendo quindi lo sviluppo di intolleranza ai carboidrati, diabete II, aterosclerosi e malattie cardiovascolari.

Per la maggior parte dei pazienti lo scorretto stile alimentare, l'inattività fisica e il conseguente sviluppo dell'obesità sono la causa più importante della sindrome (Ford 2002). Dunque il cardine della terapia è la riduzione del peso corporeo, associata ad un incremento del livello di attività fisica.

Vi è infatti una forte evidenza. Gli studi recenti hanno dimostrato infatti che le modificazioni dello stile di vita dietetiche e l'aumentato livello d'attività fisica possano rinviare o prevenire lo sviluppo dell'aterosclerosi, CVD, e la progressione di IGT a diabete II (Blackburn 2003, Goldstien 1992).

2.2 METABOLICALLY HEALTHY BUT OBESE WOMEN (MHO)

E' descritto in letteratura un sottogruppo di soggetti obesi caratterizzati dal fatto di essere metabolicamente sani, denominati MHO. Questi individui mostrano un BMI >30, FM >30% , FM >40 Kg, WC >90 cm, con un profilo lipidico, pressorio nella norma ed una buona sensibilità insulinica. Nonostante la scoperta di questa sottopopolazione risalga agli anni 80', risultano ancora incerti i criteri di diagnosi. Karelis *et al.* ha proposto di utilizzare i parametri clinici del National Cholesterol Education Program's ATP III per il profilo lipidico e l'HOMA, suggerendo di porre diagnosi quando siano soddisfatti 4 parametri su 5.

Tabella 4 Markers metabolici per definire MHO

Indice HOMA	< 1.95
Trigliceridi (mmol/l)	< 1.7
Colesterolo totale (mmol/l)	< 5.2
Colesterolo LDL (mmol/l)	< 2.6
Colesterolo HDL (mmol/l)	> 1.3

Nello stesso studio, gli individui MHO hanno mostrato livelli più bassi di HOMA, trigliceridi, colesterolo totale ed LDL, con valori di HDL più alti degli individui obesi a rischio.

Sembra che i pazienti con questo profilo siano protetti dalle complicanze metaboliche associate all'obesità.

Per quanto riguarda l'insulino-sensibilità, è stato ipotizzato che il miglior profilo di questi individui sia da attribuire in parte alla precoce d'insorgenza dell'obesità (<20 anni), che consentirebbe di mettere in atto meccanismi adattativi tali, da preservare la sensibilità insulinica; ed in parte sarebbe da attribuire al grasso viscerale che si associa a variazioni dell'insulino-sensibilità, e che negli MHO, seppur elevato, risulta inferiore rispetto ai soggetti obesi a rischio. I livelli più alti di sensibilità insulinica negli MHO, come abbiamo visto, possono essere dovuti in parte ad una riduzione dell'adiposità viscerale a fronte di una grande quantità di grasso totale. Sebbene questi soggetti presentino un BMI elevato ed una riduzione della FFM, secondo Brochu non vi sarebbero differenze significative tra i MHO e gli obesi a rischio per quanto riguarda il "Resting Metabolic Rate" ed il "Physical Activity Energy Expenditure". Potrebbero essere coinvolti altri fattori di tipo metabolico, genetico o comportamentale che andrebbero indagati con studi appropriati.

Rimangono inoltre molti dubbi sulla comprensione dei fattori che contribuiscono al profilo protettivo di questi individui. Se infatti da un lato Karelis ha dimostrato che le donne MHO in menopausa presentano valori di PCR e α -1 antitripsina più bassi degli obesi a rischio, che contribuirebbe all'aspetto protettivo di questi individui e potrebbe essere associato ad un più basso rischio cardiovascolare; dall'altro Oflaz esaminando la funzione endoteliale, lo spessore della carotide comune e i parametri antropometrici/metabolici negli individui MHO e nei soggetti magri, ha rilevato un'aumento dello spessore dell'intima ed una ridotta funzione endoteliale nei soggetti MHO a dispetto di parametri metabolici ed antropometrici risultati nella norma.

Risulta evidente che fattori diversi da quelli correlati all'obesità contribuiscano a questi cambiamenti; ne consegue che questi individui non possano essere considerati in uno stato ottimale, ma piuttosto che presentino un rischio più basso rispetto agli obesi "a rischio", ma comunque maggiore che nella popolazione generale.



Figura 2.1 Rappresentazione schematica dei soggetti MHO

2.3 METABOLICALLY OBESE, BUT NORMAL WEIGHT INDIVIDUAL (MONW)

Con il termine MONW si identificano quei soggetti con peso e BMI nella norma, ma con un cluster di anomalie correlate all'obesità.

La prima descrizione di questa sottopopolazione risale agli anni 80' e di recente è stata fatta una revisione che ne ha sancito il riconoscimento clinico.

Questi individui, sono di solito giovani e mostrano segni prematuri di insulino-resistenza, iperinsulinemia, dislipidemia che potrebbe associarsi ad un rischio aumentato di diabete e patologie cardiovascolari.

Nonostante l'evidenza clinica di questa sottopopolazione, tra l'altro molto difficile da rilevare a meno che non vengano effettuati dei controlli di screening, non c'è ancora chiarezza sui fattori coinvolti in questo profilo "di rischio". Si ritiene, comunque, che sia fattori metabolici che variabili comportamentali siano indipendentemente implicati. Tra i primi, vanno ricordati la composizione corporea e la distribuzione del grasso. Numerosi studi hanno dimostrato infatti che le donne MONW presentano un incremento relativo della massa grassa, una ridotta massa magra e la tendenza all'adiposità centrale. Inoltre i MONW presentano un "physical activity energy expenditure" inferiore alla controparte sana ed un atteggiamento "sedentario" e poco attento all'introito dietetico. Tutte queste caratteristiche contribuiscono alla ridotta sensibilità insulinica riscontrata in questi individui. E' stato ipotizzato inoltre che i MONW presentino un difetto dello stoccaggio di grasso nel tessuto adiposo che

potrebbe spiegare l'ipertrigliceridemia tipica di questi soggetti e la deposizione grassa in sedi non fisiologiche come il fegato ed il muscolo. La steatosi potrebbe contribuire così alla riduzione della sensibilità insulinica. Ancora molto resta da comprendere sulle caratteristiche fenotipiche di questo sottogruppo di popolazione che si stima tra il 18% e il 13%. Futuri campi di sviluppo comprendono lo studio degli ormoni GI e del tessuto adiposo al fine di comprendere meglio la fisiopatologia delle anomalie metaboliche dei MONW ed individuare eventualmente un profilo ormonale che permetta di distinguerli dalla controparte sana.

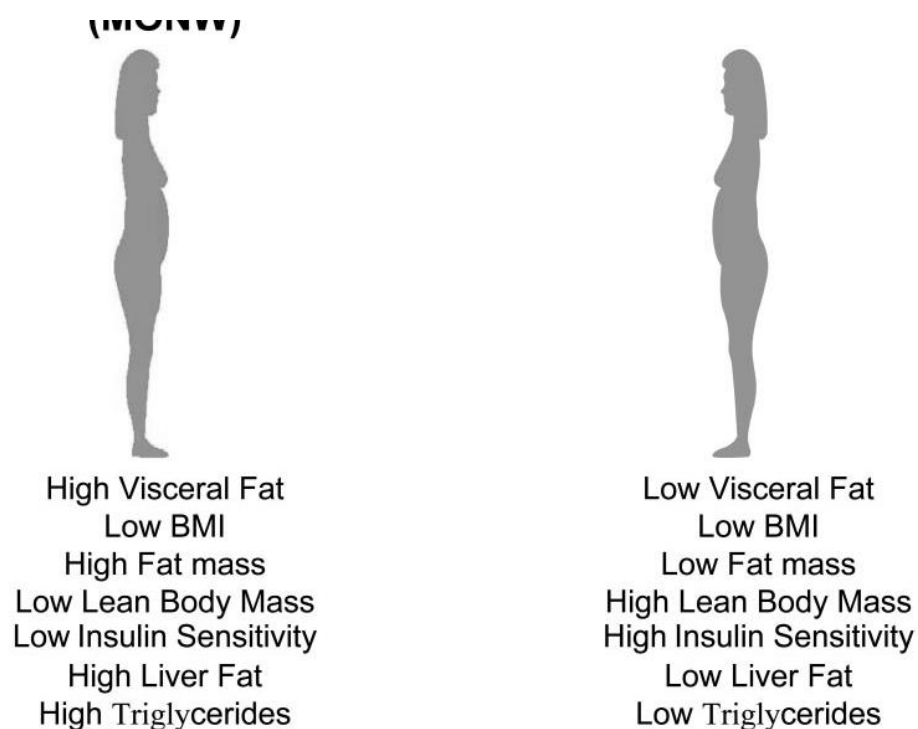


Figura 2.2 Rappresentazione schematica dei soggetti MONW

2.4 NORMAL WEIGHT OBESE SYNDROME (NWO): LA SINDROME DE LORENZO

Introduzione

E' stata identificata dal gruppo di ricerca diretto dal Prof. Antonino De Lorenzo della Facoltà di Medicina di Roma Tor Vergata una sindrome, denominata Normal Weight Obese Syndrome (NWO) o sindrome di De Lorenzo, che colpisce prevalentemente le giovani donne e le rende vulnerabili, soprattutto perchè i parametri finora in uso non identificavano questo tipo di patologia. La sindrome è caratterizzata da peso ed indici antropometrici normali, ma da una ridotta massa muscolare ed un aumento della massa grassa.

La sindrome predispone queste donne al rischio nell'età adulta di malattie cronico-degenerative. Infatti, risultano alterati i principali indici di rischio cardiovascolare, legati ai valori di trigliceridi, di colesterolo HDL e LDL; alterati anche i parametri infiammatori quali le citochine infiammatorie, la proteina C reattiva, e l'omocisteina. Mutazioni di alcuni dei geni per i mediatori dell'infiammazione e di quelli implicati nel metabolismo dell'acido folico aumentano il rischio di malattie cardiovascolari e di tumori solidi, dell'apparato gastroenterico e colon.

Oltre la predisposizione genetica gioca un ruolo importante lo stile di vita. Comportamenti a rischio sono un'alimentazione ricca di grassi e la sedentarietà, fattori modificabili in maniera mirata.

Una diagnosi precoce ed un appropriato piano dietetico e di attività fisica si impongono per un intervento di cura e prevenzione.

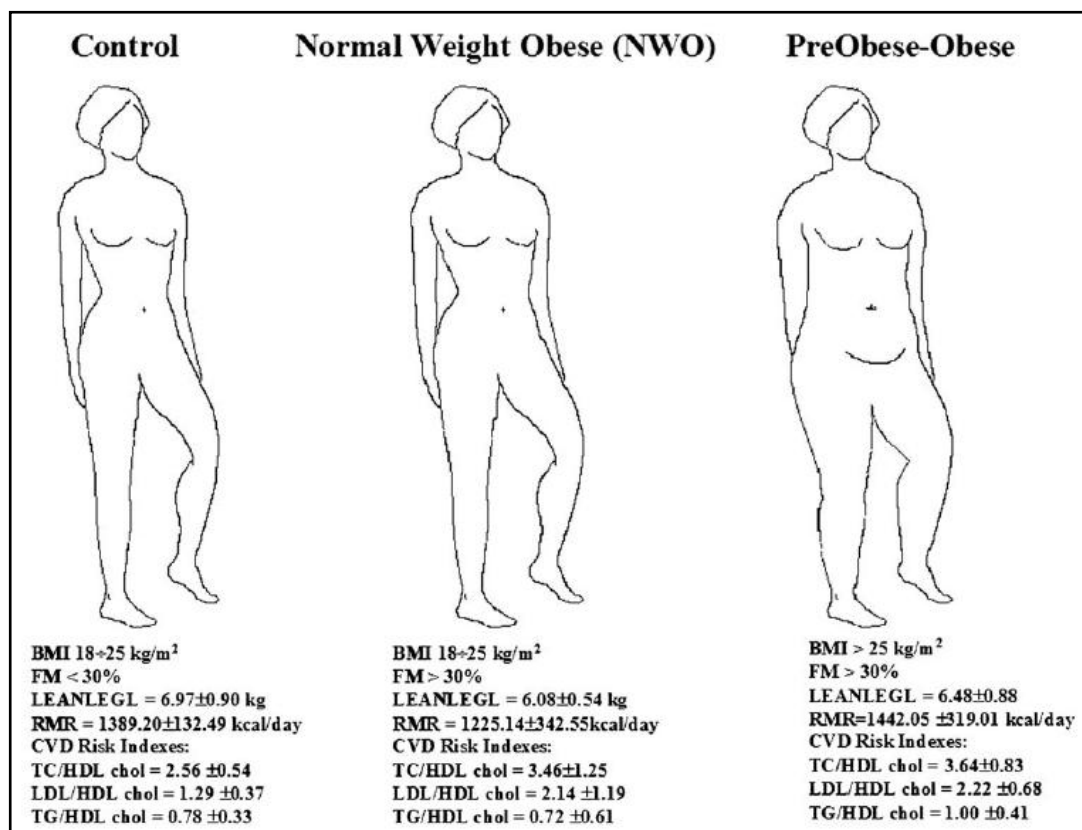


Figura 2.3 Rappresentazione schematica della sindrome NWO

Descrizione

La Figura 2.3 ben rappresenta le caratteristiche peculiari descrittive della sindrome di De Lorenzo. Le NWO vengono classificate apparentemente come donne sane, soltanto in base ai valori di peso e di Indice di Massa Corporea, che risultano essere nei valori definiti di normalità (BMI <25 kg/m²); in realtà mostrano un cluster di caratteristiche antropometriche e di composizione corporea che le rende a rischio di malattie metaboliche e cronico degenerative. Se, infatti, analizziamo la composizione corporea delle donne NWO, tramite Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA),

vediamo che la percentuale della loro massa grassa (FM%) risulta superiore al 30%, esattamente come le donne obese; mentre si osserva una riduzione significativa della massa magra, pari ad almeno 1.5 kg (FFM kg), rispetto ai soggetti normopeso, in particolare a livello della massa muscolare degli arti inferiori (Lean Mass of Left Leg, LEANLEGL).

Gli effetti della composizione corporea sul metabolismo basale (Resting Metabolic Rate, RMR), valutato mediante calorimetria indiretta, si traducono in una riduzione di circa 200 kcal al giorno, spiegabile con una riduzione della massa magra metabolicamente attiva. E' inoltre emerso che nella popolazione NWO esiste una correlazione significativa tra il RMR e la LEANLEGL.

Quanto ai parametri ematochimici, sebbene glicemia, trigliceridi, colesterolo totale, colesterolo HDL, risultino essere in un range di normalità, gli indici di rischio di malattie cardiovascolari (CVD risk indexes) sono elevati in modo significativo nelle donne NWO, avvicinandosi ai valori riscontrati nella popolazione con obesità conclamata.

Tra gli indici significativi nella popolazione NWO, si evidenziano LDL/HDL-chol, dato dal rapporto tra il colesterolo associato a lipoproteine a bassa densità (LDL) e quello legato a lipoproteine ad alta densità (HDL), il cui valore si attesta intorno a 2; e ancora TC/HDL-chol, dato dal rapporto tra colesterolo totale e colesterolo associato a lipoproteine ad alta densità (HDL), il cui valore è di circa 3. Entrambi i valori sono riscontrati anche nelle donne preobese e/o obese. Gli individui NWO esibiscono una

stretta relazione inversa tra gli indici di rischio cardiovascolare e la distribuzione del grasso corporeo; in particolare sono caratterizzati da una forte relazione tra la riduzione della LEANLEGL e l'aumento del rapporto LDL/HDL-chol (De Lorenzo et al, 2005).

Partendo da queste evidenze, la distribuzione della massa magra sembra essere un potenziale predittore di patologie cardiovascolari.

Per individuare gli individui NWO nella popolazione generale, sono stati recentemente identificati tre nuovi indicatori significativi di composizione corporea: *indice addominale* (massa magra addominale/massa grassa addominale), *indice arti inferiori* (massa magra arti inferiori/massa grassa arti inferiori) e *indice di tronco* (massa magra tronco/massa grassa tronco). Le donne NWO mostrano valori significativamente aumentati nei tre indici rispetto alle donne non obese.

Sulla base di ciò, i tre suddetti indici sembrano essere strumenti clinici promettenti per la diagnosi precoce della sindrome e di conseguenza per la prevenzione, con anni di anticipo, di CVD e DMII (Di Renzo et al, 2006).

Oltre alle caratteristiche fenotipiche che identificano le donne affette da sindrome di De Lorenzo, è necessario indagare insieme l'assetto genetico che le caratterizza.

Le NWO, infatti, mostrano un'alterazione di un cluster di geni legati all'infiammazione ed invecchiamento, caratterizzandosi anche per alcuni polimorfismi dei geni legati all'espressione di citochine infiammatorie.

Due studi recenti di De Lorenzo et al. hanno valutato l'espressione genica dell'IL-15R α e della MTHFR nelle NWO, rilevando l'esistenza di poliformismi dell'espressione genica che potrebbero rappresentare dei marker genetici di rischio in queste pazienti.

La metilene tetraidrofolatoriduttasi (MTHFR) è un importante enzima regolatore in una via del metabolismo del carbonio, poiché catalizza la riduzione irreversibile del 5,10-metilene tetraidrofolato (5,10-metileneTHF) in 5-metil tetraidrofolato (5-metilTHF), che funge da donatore metilico per la metionina. Cambiamenti in questa via metabolica si associano ad un aumentato rischio di patologie cronico-degenerative, quali CVD e cancro.

L'IL-15, invece, è una citochina rilasciata dal muscolo scheletrico, che controlla la deposizione di grasso, la crescita e la massa del WAT, e gioca un ruolo decisivo nel dialogo tra tessuto adiposo e muscolo scheletrico. IL-15 sembra essere coinvolta, infatti, nel promuovere, da un lato, la proliferazione muscolare, dall'altro, la deplezione di grasso. Si ritiene che il bilancio reciproco di segnali prodotti dall'uno e dall'altro tessuto sia necessario per una perfetta regolazione del peso corporeo.

Le donne NWO presentano specifici e caratteristici polimorfismi a carico dei geni del recettore α dell'IL-15 (IL-15R α) e della MTHFR, che incrementano in esse il rischio di carcinoma mammario e carcinoma del colon.

Un ulteriore recentissimo studio (Di Renzo et al, 2006) ha analizzato l'espressione del gene dell'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1Ra) nella sindrome Normal Weight

Obese, partendo dall'osservazione che la concentrazione plasmatica di IL-1Ra è aumentata nei soggetti obesi e la sua sintesi è sotto il controllo genetico.

IL-1Ra inibisce competitivamente il legame di IL-1 α e IL-1 β , due importanti citochine infiammatorie, ai recettori presenti sulla superficie cellulare, neutralizzandone l'azione nelle risposte infiammatorie fisiologiche e patologiche.

E' emerso che esiste un polimorfismo nel secondo introne del gene dell'IL-1Ra che è associato alla NWO sindrome. L'allele 2 è fortemente associato alla sindrome, così come correla significativamente con l'aumento della concentrazione plasmatica di IL-1 β . Inoltre, diversi studi hanno riportato che l'allele 2 dell'IL-1Ra si associa ad un rischio incrementato di carcinoma ovarico, pancreatico, cervicale e gastrico, probabilmente dovuto ad un'aumentata produzione di IL-1 β ed a un'inibizione della secrezione acida gastrica. I dati ottenuti suggeriscono che l'allele 2 dell'IL1Ra potrebbe essere un importante marker genetico di alto rischio per NWO Sindrome, cancro e patologie obesità correlate.

Per quanto concerne la modulazione dei geni legati all'infiammazione, ciclo cellulare, apoptosi ed invecchiamento, è stata osservata una up-regulation significativa di geni del ciclo cellulare i.e.: Calpactina1, c-raf-1, ciclina D3 correlabili ai fenomeni apoptotici.

Risultano attivati in modo altamente significativo i geni dello stress ossidativo quali: glutatione perossidasi, superossido dismutasi-2 e la proteina antiossidante-2, nonché il gene per il recettore della citochina proinfiammatoria TNF- α -RII.

Risulta inibita, invece, l'espressione del gene Annexin-1 regolatore del metabolismo lipidico.

Da tutti questi dati si evince che le donne NWO, pur non manifestando alterazioni metaboliche conclamate, rappresentano un sottogruppo di donne con un profilo "vulnerabile", che non le rende del tutto protette dalla possibilità di sviluppare le complicanze dell'obesità. Per questo motivo è necessario individuare precocemente questa categoria e stabilire un'appropriata terapia dietetica unita ad un regolare esercizio fisico che possa proteggerla dallo sviluppo di diabete e patologie cardiovascolari.

Tabella 5: Variabili a Confronto tra MHO, MONW e NWO

	MHO	MONW	NWO
<i>VARIABILI ANTROPOMETRICHE:</i>			
BMI (kg/m ²)	>30	<25	<25
FFM (kg)	39-40	38.9	35-36
FM (kg)	15.3	18.5	21
Body fat (%)	>30	>30	>30
VAT (cm ²)(L4-L5)	35	44	n.m.
Circonferenza Vita (cm)	65-75	69	72
RMR (kcal/die)	1389	n.m.	1225
<i>PARAMETRI BIOUMORALI:</i>			
Trigliceridi (mg/dL)	150	150	150
HDL-C (mg/dL)	>35(M)-39(F)*	<35(M)-39(F)*	>35(M)-39(F)*
Sensibilità Insulinica (HOMA-index)	<2	>2	2
<i>CITOCHINE PROINFIAMMATORIE:</i>			
hs-CRP (mg/L)	v.n.		
IL-6 (pg/mL)	v.n.		
TNF- α (pg/mL)	v.n.		
Adiponectina plasmatica (μ g/mL)	v.n.		

Legenda: n.m.= non misurato; v.n.= valori normali, nel range di normalità; *CRITERI IDF 2006.

CAPITOLO 3

METODI

3.1 SOGGETTI

Lo studio clinico, si è svolto presso l'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" nel Dipartimento di Neuroscienze, Cattedra di Alimentazione e Nutrizione Umana, diretta dal Prof. Antonino De Lorenzo. La popolazione dello studio comprendeva inizialmente 172 soggetti di entrambi i sessi di nazionalità italiana e di etnia caucasica, di età compresa tra i 20 e i 60 anni, suddivisi in funzione dei parametri di BMI e FM% in 50 normopeso (BMI <25 kg/m², range di normalità 18÷25 kg/m²; FM< 30%); 50 NWO (BMI <25 kg/m², FM >30%) e 72 pre-obesi-obesi (BMI >25 kg/m² e FM >30%). Nel corso dello studio per rinuncia da parte di alcuni soggetti alla partecipazione allo studio il numero si è ridotto al seguente:

110 soggetti nello studio sul polimorfismo dell'antagonista del recettore di IL-1 (IL-1Ra); 150 soggetti nello studio sul polimorfismo -174G/C a livello del promotore del gene di IL-6 e infine 108 soggetti nello studio sul polimorfismo del recettore alpha di IL-15 (IL-15Rá).

Tutti i partecipanti sono stati esaminati mediante anamnesi ed esame obiettivo, hanno autorizzato la partecipazione allo studio, mediante lettura e firma del consenso informato, condotto in accordo alle disposizioni del comitato etico di Medicina dell'Università di Roma "Tor Vergata". Sono stati esclusi dallo studio tutti i

pazienti in trattamento con terapie ormonali e/o anti-infiammatorie, con ipo o ipertiroidismo, con ipertensione e diabete, con neoplasie e pazienti positivati per HBV, HCV, HAV, HIV o con cirrosi epatica.

3.2 VALUTAZIONE DELLO STATO NUTRIZIONALE E COMPOSIZIONE CORPOREA

La valutazione dello stato nutrizionale deve essere parte integrante di ogni valutazione generale dello stato di salute e comprende:

- la raccolta anamnestica,
- l'esame obiettivo,
- selezionati esami di laboratorio,
- tecniche invasive e non invasive di valutazione della composizione corporea.

La valutazione della composizione corporea è fondamentale per definire lo stato di salute, così come per la diagnosi, la prognosi, il supporto nutrizionale e la terapia farmacologica.

Nel passato si è fatto ricorso al peso o alla superficie corporea del paziente per ottenere un adeguato dosaggio dei farmaci; alcuni studi dimostrano che il volume di distribuzione dei farmaci idrofili può essere correlato con la massa magra, mentre per i farmaci lipofili il volume di distribuzione può essere correlato con il peso. La misura della massa magra è inoltre utile nell'individuare le dosi di mantenimento di molti farmaci che sono eliminati con l'emuntorio epatico, specialmente nei soggetti obesi.

ANAMNESI. L'anamnesi clinico-nutrizionale è basata sulla comprensione delle cause e della fisiopatologia della malnutrizione per eccesso/difetto e dovrebbe focalizzarsi sui cambiamenti della dieta e del peso corporeo, sulle condizioni socioeconomiche e sui sintomi tipici di ciascuna condizione clinica.

ESAME OBIETTIVO. Un esame obiettivo attento può identificare il grado di malnutrizione.

A tale scopo, la prima valutazione clinica da effettuare si basa essenzialmente sulla misurazione dei parametri antropometrici, quali: il peso, l'altezza, l'indice di massa corporea (BMI, ottenuto dal rapporto fra il peso corporeo in chilogrammi ed il quadrato della statura in metri (kg/m^2), la circonferenza vita, la circonferenza fianchi ed il loro rapporto (WHR).

A quest'ultimi, si devono aggiungere ulteriori misurazioni della composizione corporea mediante l'utilizzo di strumenti idonei.

Composizione corporea: modelli compartimentali

Secondo il modello anatomico-funzionale proposto da Magnus-Levy, il cosiddetto modello bicompartimentale, il corpo umano è costituito da due compartimenti principali : *massa grassa* (FM, Fat Mass) e *massa libera dal grasso* (FFM, Fat Free Mass):

- la massa grassa (FM) è costituita prevalentemente da lipidi e caratterizzata da una densità di circa 0,9 g/ml; quest'area è a sua volta suddivisibile in due componenti, quella di deposito e quella essenziale;
- la massa magra o massa priva di grasso (FFM) è composta da glicogeno e sali minerali, proteine, ed acqua totale (Total Body Water, TBW); è caratterizzata da una densità totale pari a circa 1,099-1,100 g/ml, risultante dalla densità della componente minerale, in gran parte ossea (3,000 g/ml), della componente proteica (1,340 g/ml) e dell'acqua (0,993 g/ml). In particolare questo comparto è formato dai muscoli, dai visceri, dallo scheletro, dall'acqua intra ed extracellulare, dai sali, dal glicogeno e dai minerali extraossei. Prendendo in considerazione le tre suddette componenti della FFM, queste, aggiunte alla FM, costituiscono il modello tetracompartimentale di Keys e Brozek (Tabella 3.1).

Un terzo modello, il tricompartimentale, si basa sulla suddivisione interna della massa magra in:

- *massa cellulare corporea* (Body Cell Mass, BCM), quel distretto funzionale corporeo comprendente tutti i tessuti ricchi di potassio, che consumano ossigeno ed ossidano substrati energetici; è dunque la componente metabolicamente attiva della FFM;
- *massa extracellulare* (Extra Cellular Mass, ECM).

Nel 1953, Keys & Brozek hanno inoltre introdotto il concetto di *massa magra corporea* (Lean Body Mass, LBM), il comparto composto di tutti i tessuti compresi nella FFM più il cosiddetto “grasso essenziale”, rappresentato dai lipidi contenuti

nelle membrane cellulari, nel sistema nervoso centrale e periferico e, nella femmina, il grasso legato ai caratteri sessuali secondari (mammelle e fianchi).

Tabella 3.1 MODELLI BICOMPARTIMENTALE E TETRACOMPARTIMENTALE

	MODELLO BICOMPARTIMENTALE	MODELLO TETRACOMPARTIMENTALE
BODY WEIGHT	massa grassa (FM) d = 0,900 g/ml	
	massa magra (FFM) D = 1,099-1,100 g/ml	sali minerali e glicogeno d = 3,000 g/ml
		Proteine d = 1,340 g/ml
		acqua totale (TBW) d = 0,993 g/ml

Un'altra importante suddivisione riguarda l'acqua totale corporea, TBW (Tabella 3.2), che è distinguibile in:

- acqua intracellulare, ricca di potassio e povera di sodio, rappresenta il 40-50% del peso corporeo;
- acqua extracellulare, che rappresenta il 20-25% del peso corporeo e comprende quattro ulteriori settori:
- plasmatico, ricco di sodio e proteine, costituisce il volume sanguigno o volemia;

- interstiziale, costituito dall'acqua che circonda le cellule, dall'acqua delle sierose, dal liquido cefalorachidiano, dalla linfa, etc.; la sua composizione è simile a quella del plasma e se ne differenzia per la sua povertà di proteine.
- Le alterazioni di questo settore comportano la costituzione di un terzo spazio che raccoglie i liquidi, ovvero l'edema;
- tessuto connettivo, osseo e cartilagineo;
- transcellulare.

Tabella 3.2: Distribuzione dell'acqua nei distretti corporei

DISTRETTI CORPOREI	TBW (%)	SODIO (%)	CLORO (%)	POTASSIO (%)
EXTRACELLULARE	45,0	91,0	87,6	10,4
Plasma	7,5	11,2	13,6	0,4
Interstiziale	20,0	29,0	37,3	1,0
Tessuto connettivo e cartilagineo	7,5	11,7	17,0	0,4
Tessuto osseo	7,5	36,5	15,2	7,6
Transcellulare	2,5	2,6	4,5	1,0
INTRACELLULARE	55,0	9,0	12,4	89,6

Infine, nel processo di accertamento e valutazione della composizione corporea, il modello a cinque livelli, proposto in "step" consecutivi, risulta attualmente quello più

completo ed innovativo. Tale modello ha lo scopo di facilitare l'interpretazione delle diverse componenti negli aspetti della composizione tissutale e biologica e di associare ad ogni aspetto la metodica che specificamente ne permette la valutazione, e distingue:

- il *I livello o atomico*, riferito ai principali elementi corporei (idrogeno, azoto, ossigeno, carbonio, etc.) valutabili con tecniche complesse o semplici (ad esempio la misurazione del bilancio dell'azoto o le tecniche di diluizione isotopica);
- il *II livello o molecolare*, che considera componenti come l'acqua, le proteine, la componente minerale nel suo insieme; tra le metodiche, l'impedenzometria-BIA consente di misurare l'acqua corporea totale presente quasi esclusivamente nella massa magra;
- il *III livello o cellulare*, riferito alla componente cellulare (solida e fluida), correlata alla massa cellulare metabolicamente attiva (responsabile del metabolismo corporeo) e valutabile, ad esempio, con la misurazione del potassio totale corporeo, alla massa extracellulare (solida e liquida) ed alla massa grassa;
- il *IV livello*, in cui trovano definizione il tessuto adiposo (sottocutaneo e viscerale), la muscolatura scheletrica, i visceri, la massa ossea, o il sangue, valutabili mediante misurazioni dirette di indici bioumorali o metodiche antropometriche indirette;
- il *V livello o corporeo totale*, più complesso, analizzabile mediante tecniche semplici e non invasive (plicometria) o metodiche diversamente accurate ed invasive (ad esempio la densitometria a doppio raggio fotonico-DXA, che consente la

valutazione del contenuto e della densità minerale ossea e la misura diretta di parti molli, FM e massa magra o Lean Body Mass (LBM), o la Risonanza Magnetica Nucleare, che permette di valutare gli organi interni e la massa muscolare).³⁸

3.3 TECNICHE DI VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA

I differenti compartimenti possono essere misurati con diverse tecniche, classificabili in base al grado di facilità d'esecuzione, all'accuratezza e al costo. (Tabelle 3.3, 3.4). Il criterio più importante è comunque quello della "non invasività", ovvero del minimo disagio possibile arrecato al paziente; per questo le tecniche di valutazione della composizione corporea si distinguono in tecniche non invasive ed invasive.

Tabella 3.3 Tecniche di misura per i modelli bicompartimentali

TECNICHE DI MISURA	VANTAGGI	SVANTAGGI
Acqua totale corporea (diluizione isotopica)	Necessita di minima collaborazione.	L'isotopo ^{18}O ed il deuterio sono costosi, il tritio è radioattivo.
Densità corporea (Pesata Idrostatica)	Semplice.	Difficile da eseguire in alcuni soggetti.
Potassio totale corporeo	Quasi tutto il potassio è contenuto nei fluidi intracellulari.	La strumentazione è costosa.
Azoto totale corporeo	Quasi tutto l'azoto è contenuto nei fluidi intracellulari	La strumentazione è costosa, c'è esposizione a radiazioni.
Bilancio azotato	I piccoli cambiamenti vengono misurati.	È richiesta collaborazione, c'è necessità di laboratori di analisi.
Escrezione della creatinina urinaria	Costo contenuto.	E' richiesta collaborazione, è influenzata dalla dieta.
Impedenza bioelettrica	Facile, costo contenuto, stima della TBW.	Applicazione di formule, approssimazione elevata nella stima dei cambiamenti della FFM.
Antropometrica	Facile, costo contenuto.	Approssimazione elevata nella stima della FM.

Tabella 3.4 Tecniche di misura per lo studio multicompartimentale

TECNICHE DI MISURA	VANTAGGI	SVANTAGGI
Densitometria a doppio raggio fotonico (DXA)	Misura i tessuti molli, il grasso, la componente ossea, la massa magra; minima esposizione a radiazioni.	La strumentazione è costosa,.
Tomografia Computerizzata (TC)	Delinea le misure degli organi, distribuzione del grasso e dei muscoli, le dimensioni ossee.	La strumentazione è costosa, notevole esposizione a radiazioni
Risonanza Magnetica (RMN)	Delinea le misure degli organi, distribuzione del grasso e dei muscoli, l'acqua totale corporea	La strumentazione è molto costosa.
Applicazione combinata di varie tecniche	Misurazione di FM, acqua, proteine e minerali	Necessità di molti strumenti.

3.4 ANTROPOMETRIA

Il peso corporeo (espresso in chilogrammi, kg) e la statura (espressa in metri, m) sono le misure antropometriche più largamente utilizzate per gli studi di tipo epidemiologico sullo stato nutrizionale di una popolazione. Il valore predittivo di tali parametri per definire la composizione corporea rimane tuttavia scarso: considerando il peso corporeo come determinato dalla somma di due compartimenti - massa grassa (FM) e massa libera da grasso (FFM) - la determinazione del solo peso corporeo non risulta informativa dei rapporti relativi fra le stesse. Si rende così necessario il ricorso ad indici che, utilizzando i predetti parametri, possano

rappresentare misure di riferimento valide circa l'adiposità degli individui. I parametri di obesità più idonei a tale scopo sono gli indici peso corporeo/statura.

Fra essi l'*Indice di Quetelet* o *Indice di Massa Corporea* (*Body Mass Index*, BMI), ottenuto dal rapporto fra il peso corporeo espresso in chilogrammi ed il quadrato della statura espressa in metri (kg/m^2), è considerato come il più valido indicatore dell'obesità, in quanto meno correlato con la statura rispetto ad altri. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito come limite fra peso corporeo normale ed obesità il valore di BMI pari a 30 kg/m^2 (si veda la [tabella 3.6](#)).

Il BMI è correlato con la massa grassa e ne spiega la variabilità solo nella misura del 60-80% e rappresenta pertanto anche un indicatore dell'altro compartimento corporeo, la massa magra. Dal confronto fra i valori di BMI e le percentuali di massa grassa (misurate con metodica densitometrica) è emerso che il BMI risulta significativamente correlato con la quantità di massa grassa, con un errore standard tra il 3% ed il 6% del peso corporeo; il confronto per singolo individuo risulta invece scarsamente predittivo, riuscendo il BMI a spiegare solo poco più del 50% della varianza del contenuto percentuale di massa grassa. Quindi individui con lo stesso BMI possono avere una quantità di grasso corporeo notevolmente diversa. La predizione risulta inoltre influenzata da errori sistematici tendendo a sovrastimare il contenuto di grasso nei giovani ed a sottostimarli negli anziani, senza considerare la non applicabilità della formula in alcuni gruppi di soggetti per i quali la quota relativa di massa grassa risulta sovrastimata (donne in gravidanza e atleti) o sottostimata (soggetti disidratati) e la non affidabilità di applicazione nelle popolazioni pediatriche

(a causa dell'assenza di parametri di riferimento e della limitata possibilità di confronto tra popolazioni etnicamente diverse). Per tali motivi viene impiegato principalmente negli studi di popolazione e come indagine di screening per la valutazione dell'obesità.

Tabella 3.5 Vantaggi e svantaggi dell'uso dell'indice peso/statura:

VANTAGGI	SVANTAGGI
Semplicità di raccolta dei dati	Possibilità di misclassificazione in particolari tipologie di soggetti
Misura con errore analitico trascurabile	Possibilità di misclassificazione in particolari condizioni fisiologiche
Possibilità di utilizzare dati self-reported	Mancanza di dati ritenuti affidabili Su popolazioni pediatriche
Costo trascurabile	Variazione dei parametri in età geriatrica
Semplice confrontabilità dei dati In studi policentrici	Limitata precisione nella stima del grasso corporeo in soggetti atipici

La misurazione delle *circonferenze corporee* in particolari distretti fornisce informazioni in merito alla quota ed alla distribuzione della massa muscolare e della massa grassa, sia regionalmente, sia a livello dell'intero corpo.

Il valore del rapporto circonferenza vita/circonferenza fianchi (Waist to Hip, W/H) fornisce informazioni sulla distribuzione del grasso a livello addominale così da poter

classificare l'obesità come ginoide o androide (i limiti per una distribuzione del grasso androide sono individuati nei valori del rapporto W/H pari a 1.00 per gli uomini e 0.85 per le donne).

Il rapporto W/H è facilmente ottenibile, poco dispendioso e non invasivo, ed è diffusamente considerato nella pratica clinica come un valido indice di distribuzione della massa grassa corporea ed un buon predittore delle complicanze correlate all'obesità (si veda la [figura 2.6](#)).

TABELLA 3.6: Classificazione dell'obesità e definizione del rischio relativo in base al BMI ed alla circonferenza vita (OMS, 1997)

			RISCHIO RELATIVO	
DEFINIZIONE	BMI (Body Mass Index)	<i>UOMINI:</i> <i>DONNE:</i>	CIRCONFERENZA VITA $\leq 102\text{ cm}$ $\leq 88\text{ cm}$	CIRCONFERENZA VITA $\geq 102\text{ cm}$ $\geq 88\text{ cm}$
SOTTOPESO	<18.5			
NORMOPESO	18.5-24.9			Aumentato
PREOBESITÀ	25.0-29.9		Aumentato	Alto
OBESITÀ	30.0-34.9	(GRADO I)	Alto	molto alto
	35.0-39.9	(GRADO II)	molto alto	molto alto
	>40.0	(GRADO III)	enormemente alto	enormemente alto

3.5 IMPEDENZIOMETRIA

La capacità del corpo umano di condurre corrente elettrica è nota da più di cento anni. Nel 1800 *Volta* dimostrava che l'interfaccia elettrodo–elettrolita costituiva la sorgente di un potenziale elettrico. *Ohm* nel 1826 sceglieva una coppia bismuto termofila come sorgente del potenziale elettrico; ciò avrebbe condotto alla formulazione della legge che porta il suo nome. Successivamente è stato ipotizzato che l'interfaccia elettrodo–elettrolita possedesse proprietà di capacità. La prima misura della capacità dell'interfaccia veniva effettuata nel 1871 da *Varley*. Il primo modello di soluzione elettrolitica con misura della capacità viene attribuito ad *Helmholtz* nel 1879. Oggi è noto che i tessuti acquosi del corpo possono essere considerati alla stregua di soluzioni elettrolitiche, contenendo l'acqua corporea numerosi soluti.

L'impedenziometria (BIA, *Bioelectrical Impedance Analysis*) (*Schoeller D. A.*) è stata messa a punto allo scopo di misurare numerosi aspetti della composizione corporea, incluso l'acqua totale corporea (TBW, *Total Body Water*), l'acqua intracellulare (ICW, *Intra Cellular Water*), l'acqua extracellulare (ECW, *Extra Cellular Water*), la massa magra (FFM, *Fat Free Mass*), la massa cellulare metabolicamente attiva (BCM, *Body Cell Mass*) e il grasso corporeo (FM, *Fat Mass*). Più correttamente, l'impedenziometria non è in grado di *misurare* direttamente nessuno dei parametri citati. Per essere più esatti, questa tecnica misura la resistenza del corpo al passaggio di una corrente elettrica. La resistenza, o il suo opposto, la conduttanza, è una delle proprietà colligative di una soluzione. Dipende dalla concentrazione salina

della soluzione, dalla forza ionica dei sali, dalla mobilità degli ioni, e dalla geometria del fluido, per citare solo i principali fattori che influenzano la conduttività.

Come proposto nelle prime pubblicazioni di *Hoffer*, in condizioni controllate di queste variabili maggiori, l'impedenziometria può fornire una misura diretta del volume della soluzione. Più specificamente, se una soluzione acquosa di note proprietà ioniche è posta in un cilindro di dimensioni uniformi, allora la resistenza A della soluzione potrebbe essere data da:

$$R = \rho L/A$$

dove ρ è la resistività specifica per unità di lunghezza e per area della sezione, L è la lunghezza del cilindro, ed A è l'area della sezione. Riarrangiando questa equazione si ha quanto segue:

$$A = \rho L/R$$

Moltiplicando tutti e due i membri di questa equazione per la lunghezza del cilindro si ottiene la seguente formula:

$$V = \rho L^2/R$$

dove V è il volume. La misurazione della resistenza può, quindi, essere correlata direttamente al volume della soluzione. Questa proprietà ha permesso l'utilizzazione della metodica BIA (*impedenza bioelettrica*) per la valutazione dei distretti corporei, sfruttando le caratteristiche elettriche dei tessuti al passaggio di corrente alternata (la corrente non può essere erogata in modo continuo per evitare fenomeni di elettrolisi).

Si considera il tessuto biologico come costituito da due distretti fluidi: extracellulari

(ECW, *Extra Cellular Water*) ed intracellulari (ICW, *Intra Cellular Water*). Il comportamento elettrico dei tessuti corporei è equiparabile a quello di un circuito elettrico costituito da una resistenza ed un condensatore in parallelo, in cui il comparto intracellulare (ICW) funge da condensatore e quello extracellulare (ECW) simula la resistenza. La corrente (I) attraverserà il tratto capacitivo ICW (I_{ICF}) e, preferenzialmente, il tratto resistivo ECW (I_{ECF}). Il tratto resistivo esplicherà il suo effetto oppositivo in modo continuo e costante nel tempo e proporzionalmente alla quantità di elettroliti presenti nel comparto ECW. Il tratto ICW, ossia il condensatore, permetterà un buon passaggio di corrente da una certa frequenza di corrente in poi (>5 Khertz), determinando uno sfasamento del flusso di corrente in uscita. Tale effetto si chiama reattanza capacitiva (X_c). L'impedenza (Z), rappresentata in forma vettoriale, esprime l'impedimento totale al passaggio di corrente essendo la somma degli effetti del tratto resistivo (R_z) e capacitivo (X_c).

Il corpo umano viene, quindi, assimilato ad un cilindro conduttore in cui $R = \rho H/S$ (dove R è la resistenza, H è la statura del soggetto sottoposto alla misurazione, ed S è la sezione traversa, che per convenzione si assume costante). Da qui: $V = \rho H^2/R$ (equazione che relaziona il volume del cilindro con il valore della resistenza).

Tale equazione risulta alla base delle formule per la determinazione della TBW o della FFM. In particolare, la seguente equazione:

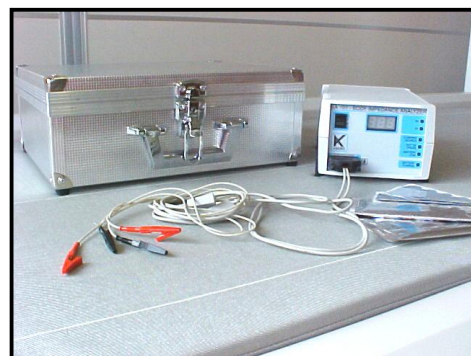
$$TBW = a(H^2/R) + b$$

(equazione di tipo lineare, dove i coefficienti a e b sono calcolati su popolazioni specifiche) pone in relazione il volume di acqua totale corporea (TBW) e l'indice BIA (H^2/R). Quindi, dopo la misura dell'impedenza corporea (Z) con l'apposito strumento (impedenziometro), essa viene inserita in apposite formule per la determinazione della TBW o della FFM.

Esistono diversi tipi di apparecchi impedenziometrici; alcuni vengono definiti *monofrequenziali*, dal momento che erogano corrente alternata alla frequenza costante di 50 kHz.

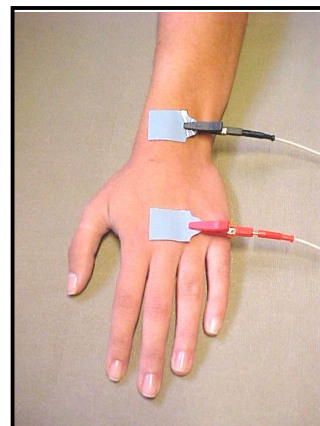
Attualmente vengono utilizzati anche impedenziometri che lavorano a più frequenze, detti *multifrequenziali*. Si è, infatti, visto che mentre a bassa frequenza il contributo resistivo è massimalmente dovuto al comparto extra-cellulare, ad alta frequenza anche il tratto capacitivo fa sentire la sua influenza, man mano che i vari condensatori si “attivano”, sfasando più o meno la corrente in uscita. In tal modo, da una serie di misure di resistenza $A.$, reattanza (X_c), angolo di fase (f) e impedenza (Z), ottenute a varie frequenze di corrente erogata, è possibile determinare la cosiddetta frequenza caratteristica (F_c). Tale parametro, introdotto in formule più complesse di quella fondamentale, permette la determinazione di valori più accurati di TBW, ICW, ECW, e quindi di FFM.

Impedenziometro monofrequenziale Akern.



La metodica BIA si serve di elettrodi applicati in particolari punti di repere sulla mano e sul piede.

La disposizione degli elettrodi varia a seconda che la misurazione effettuata sia “*a tutto corpo*” o “*segmentale*”. La misurazione a tutto corpo può essere a sua volta effettuata con modalità “*distale*” o “*prossimale*”.



Per la BIA a tutto corpo effettuata con modalità distale, gli elettrodi sono così sistemati (Lukaski et al., 1985): i) iniettori:

sulla superficie dorsale della mano e del piede ai metacarpi e metatarsi distali rispettivamente; ii) sensori: tra le prominenze distali del radio e dell'ulna e tra il malleolo mediale e laterale della caviglia (vedi Figura 6). Gli elettrodi devono essere distanti almeno 5 cm. È questa la distanza minima che garantisce l'assenza d'interferenza elettromagnetica tra elettrodi iniettori e sensori (Deurenberg, 1994).

Un particolare problema è rappresentato dalla scelta dell'emisoma su cui effettuare la registrazione. Alcuni Autori hanno infatti osservato valori d'impedenza maggiori per l'emisoma destro rispetto al sinistro. Nella pratica, l'emisoma sinistro è quello di riferimento.

Cavi di collegamento allo strumento

Adeguatamente schermati, essi devono correre in modo rettilineo e senza venire in contatto tra loro su di una superficie non conduttiva, lontano dai campi elettromagnetici. Poiché anche il calcolatore elettronico eventualmente collegato allo

strumento è una sorgente di campi elettromagnetici, esso deve essere tenuto a debita distanza dai cavi di collegamento. Si rammenta che la possibilità di interferenze cresce all'aumentare della frequenza della corrente somministrata.

Posizione del soggetto

Il soggetto giace supino su di una superficie piana non conduttiva. Gli arti sono abdotti di 30°-45° per evitare cortocircuitamenti della corrente prodotti dal contatto tra gli arti inferiori o tra gli arti superiori e il tronco (*Lukaski et al., 1985*). La postura assunta dal soggetto è fondamentale per l'interpretazione del dato impedenziometrico. Il passaggio dalla posizione eretta a quella supina è associato ad un rapido declino dell'impedenza ($\approx 3\%$), imputabile al movimento di liquidi dal versante interstiziale a quello vascolare (*Roos et al., 1992*).

L'analisi dell'impedenza corporea consente misure più accurate dell'adiposità rispetto alle metodiche antropometriche (plicometria e circonferenze corporee), sebbene queste ultime possano fornire utili informazioni relative alla distribuzione della massa grassa. In aggiunta, l'impedenziometria può essere più facilmente standardizzata e trova applicazione nei programmi di trattamento (per produrre un bilanciato calo ponderale) degli obesi a lungo termine. L'errore di misura della metodica impedenziometrica sulla percentuale di massa grassa corporea è risultato pari a circa il 10% del peso corporeo.

Preparazione della cute

La conducibilità elettrica della cute è migliorata dal pretrattamento con alcool etilico o isopropilico (*Kushner, 1992*). Tale trattamento allontana infatti secrezioni e cellule desquamate dallo strato corneo. È da evitare l'impiego di sostanze contenenti elettroliti (ad esempio derivati dell'ammonio quaternario) in quanto in grado di modificare artificialmente la conducibilità elettrica della cute. È indicata la rimozione di peluria abbondante.

Cibo e bevande

Kushner (1992) consiglia che il soggetto sia a digiuno da liquidi e solidi da almeno 2-5 ore. Il contenuto del canale alimentare può infatti interferire con la misurazione dell'impedenza. Inoltre, nella fase post-assorbitiva, il passaggio di liquidi nel torrente circolatorio può produrre valori spuri di impedenza. Tuttavia, *Fogelholm et al. (1993)* hanno osservato che l'errore prodotto dalla misurazione dell'impedenza a 2-5 ore da un pasto può essere accettabile a livello di gruppo ma non del singolo individuo. Pertanto, essi propongono una notte di digiuno (8 h) quale procedura standard per la BIA.

Ciclo mestruale

Il ciclo mestruale comporta variazioni "fisiologiche" dell'impedenza bioelettrica. Esse sono state poste in relazione a: I) modificazioni della compartimentazione di TBW, come ad esempio, la possibile espansione premestruale di ECW, II) modificazioni della temperatura corporea, per l'effetto termogenico del progesterone e, III)

modificazioni del comportamento alimentare, particolarmente in fase premenstruale. *Gleichauf & Roe* (1989) hanno osservato che la variabilità nella misurazione dell'impedenza nel corso di un ciclo mestruale è da imputare più alla variazione fisiologica che non all'errore di misurazione. Esse consigliano di standardizzare la misurazione relativamente al periodo del ciclo mestruale e di effettuare, ove possibile, misurazioni multiple. L'impiego di contraccettivi orali non è apparentemente associato ad alterazioni dell'impedenza (*Chumlea et al., 1987*).

3.6 DEXA (DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY)

La Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA o DEXA) è una tecnica relativamente nuova, inizialmente utilizzata per la determinazione della densità minerale ossea e successivamente impiegata anche nell'analisi dei tessuti molli, massa lipidica (FM) e massa alipidica (FFM).

L'attenuazione che un tessuto biologico oppone ad un fascio incidente di radiazioni è funzione dello spessore, della densità e della composizione chimica del tessuto stesso. La metodica DXA per lo studio della massa grassa ed in generale dei tessuti molli si basa sul principio che tali tessuti determinano una attenuazione costante all'emissione di due definite radiazioni energetiche di 40 kV e 70 kV (raggi X). Il fenomeno dell'attenuazione si basa sull'effetto fotoelettrico e sull'effetto *Compton*. Nella realtà il fenomeno della attenuazione non è lineare, tuttavia assumendo che sia costante, si ha per un tessuto costituito da sola massa lipidica $R_f = 1,21$, e per un

tessuto costituito da sola massa alipidica $RI = 1,399$; l'attenuazione per il tessuto osseo risulterebbe molto più alta. Poiché nell'organismo umano ogni tessuto è costituito da più componenti in proporzioni diverse, l'attenuazione energetica risultante corrisponde ad un valore medio.

È stata elaborata la seguente espressione:

$$RfI = \frac{(RfI - Rf)}{(RI - Rf)}$$

dove:

RfI: attenuazione misurata e *Rf* e *RI* rispettivamente le costanti riferite al solo tessuto lipidico ed al solo tessuto alipidico.

Nella misura della massa lipidica corporea, si ritiene che il 40-45% dei pixel contiene massa minerale ossea e che il restante (circa la metà del volume corporeo) è rappresentato dai tessuti molli.

Il sistema DXA consta di un piano di rilevazione in cui sono inseriti i sensori per il rilevamento dell'attenuazione. A tale piano viene applicato un carrello mobile che scorre longitudinalmente e che trasporta l'emettitore di energia che a sua volta può scorrere su binari in modo trasversale mediante un motore di precisione. Per mezzo di un computer idoneo si determina il moto longitudinale e trasversale dell'emettitore, l'acquisizione dei dati di attenuazione rilevati e la successiva elaborazione dei dati per la stampa o la lettura dei risultati della composizione corporea. È in preparazione

una strumentazione che prevede l'uso di un triplice raggio energetico come estensione della metodica DXA.

Apparecchiatura DXA



L'errore di tale metodica è stato valutato intorno al 3–4% per la massa lipidica corporea e dipende prevalentemente da stati di alterata idratazione e dallo spessore antero-posteriore corporeo (quest'ultimo se maggiore di 20 *cm* comporta un errore superiore a quello definito). La tecnica DXA risulta un metodo preciso ed accurato per la misura della massa grassa corporea totale e distrettuale. La misura del grasso distrettuale risulta più accurata e precisa in soggetti adulti con peso corporeo inferiore a 100 *kg*. La misura della massa lipidica corporea a livello intraddominale è stata studiata con la metodica tomografica (TC, metodica di riferimento) e confrontata con le determinazioni ottenute mediante antropometria (plicometria) e DXA; le misure della massa lipidica addominale ottenute con metodica DXA risultavano valide ed il valore predittivo veniva migliorato dalla combinazione con le misure antropometriche.

Quindi la bassa invasività (<0,08 mSv, con CV%=100 X SD/mean, variabile tra il 2% e il 5%) rispetto alle metodiche di immagine (es: Tomografia Computerizzata) e la possibilità di ottenere misure segmentali corporee (tessuto adiposo intraddominale), consigliano l'utilizzo di tale tecnica a scopo prognostico e diagnostico per il paziente obeso.

Tabella 3.7 Parametri relativi alla massa grassa di soggetti caucasici in relazione all'età (i valori sono espressi come percentuale di massa grassa in rapporto al peso corporeo)

Età (anni)	Sesso	Classificazione				
		Eccellente	Buono	Accettabile	Pre-obesità	Obesità
<19	Maschi	12	16.1-17.0	17.1-22.0	22.1-27.0	>27.1
	Femmine	17	17.1-22.0	22.1-27.0	27.1-32.0	>32.1
20-29	Maschi	13	13.1-18.0	18.1-23.0	23.1-28.0	>28.1
	Femmine	18	18.1-23.0	23.1-28.0	28.1-33.0	>33.1
30-39	Maschi	14	14.1-19.0	19.1-24.0	24.1-29.0	>29.1
	Femmine	19	19.1-24.0	24.1-29.0	29.1-34.0	>34.1
40-49	Maschi	15	15.1-20.0	20.1-25.0	25.1-30.0	>30.1
	Femmine	20	20.1-25.0	25.1-30.0	30.1-35.0	>35.1
>50	Maschi	16	16.1-21.0	21.1-26.0	26.1-31.0	>31.1
	Femmine	21	21.1-26.0	26.1-31.0	31.1-36.0	>36.1

3.7 ANALISI EMATOCHIMICHE

I campioni di sangue, circa 10 ml in EDTA, sono stati prelevati dai soggetti la mattina a digiuno da almeno 12 ore, attraverso puntura endovenosa. Il sangue così prelevato è stato immediatamente posto in ghiaccio e successivamente centrifugato a 1600 x g per 10 minuti a 4°C. Il plasma è stato quindi rimosso, aliquotato e conservato in frigorifero a -80°C.

Le concentrazioni del colesterolo totale (TC), del colesterolo-High Density Lipoprotein (HDL-chol), del colesterolo-Low Density Lipoprotein (LDL-chol) e dei trigliceridi (TG) sono state determinate con metodiche colorimetriche standard (Roche Modular P800, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) in accordo al protocollo fornito nei kit diagnostici. Il profilo lipidico così ottenuto è stato quindi utilizzato per la valutazione del rischio CV. La concentrazione della high-sensitivity C-Reactive Protein (hs-CRP) è stata misurata nel plasma conservato a -80°C usando un saggio ad alta sensibilità (latex-enhanced high-sensitivity assay), mediante misura nefelometrica (BN-100 nephelometer; Behring Diagnostic, Westwood, Massachusetts) con un calibratore specifico (N rheumatology standards SL) fornito dallo stesso fornitore.

Il glucosio plasmatico è stato misurato utilizzando il metodo della glucosio ossidasi con un analizzatore automatico (COBAS INTEGRA 400, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). L'insulina è stata determinata mediante un dosaggio immunoenzimometrico (Medgenix Ins-EASIA, Biosource, Belgium). La resistenza

all'insulina è stata determinata mediante la metodologia HOMA-IR (Homeostasis model assessment-insulin resistance) usando la seguente formula:

$[(\text{fasting glucose (mmol/l)} \times \text{fastig insulin } (\mu\text{U/l}))/22.5]$.

Le analisi fatte sono tutte standardizzate e accreditate dal Laboratorio di Chimica Clinica del Policlinico Universitario di Tor Vergata (PTV) di Roma.

3.8 RICERCA DI BIOMARCATORI

Lo studio è stato condotto misurando nel sangue i seguenti biomarcatori:

- a. Polimorfismi genetici
- b. Proteine plasmatiche

Determinazione genotipica: Analisi del polimorfismo genetico (SNPs)

Il DNA genomico, da sangue venoso periferico raccolto in EDTA, è estratto secondo la metodica Amersham (Kit, Life Science).

L'analisi prevede le seguenti tappe:

1. estrazione del DNA genomico, con Kit commerciali
 - a) deproteinizzazione del campione con tampone di lisi e Proteinasi-K.
 - b) Separazione ed eluizione su colonna
 - c) Conservazione del DNA estratto a -20°C

Il DNA del plasma viene preparato per estrazione secondo protocollo QIAamp mini kit, Quiagen, usando il protocollo per l'isolamento del DNA da fluidi biologici fornito dalla ditta e modificato come segue: 5 ug di RNA poly(A) vengono aggiunti a 1 ml di

plasma come carrier per il recupero ottimale di piccole quantità di DNA presente nel plasma. Il campione viene lisato con 20uL di una soluzione di Proteinasi-K e 1 ml tampone di lisi. Dopo 10 min di incubazione a 56°C viene aggiunto 1 ml di etanolo. La miscela caricata su colonna fornita dal kit viene centrifugata, lavata ed eluita con apposito tampone.

2. Amplificazione di regioni geniche di interesse con tecnica PCR
3. Analisi del risultato con indagine elettroforetica su gel di agarosio (1-3%), previo trattamento con enzimi di restrizione selezionati, e colorazione con etidio bromuro

Raccolta e preparazione materiale biologico

Il prelievo deve prevedere una quantità di sangue non inferiore ai 5 ml, in vacutainer con EDTA 15%. Una volta avvenuto il prelievo, la vacutainer va agitata delicatamente.

Il sangue va mantenuto alla temperatura di 4°C.

Dalla provetta viene prelevato 1 ml di sangue intero e posto in un tubo di adeguata capacità (in ghiaccio).

Il sangue rimanente è centrifugato per 10 minuti, a 4°C, 1300 rpm. Il surnatante va suddiviso in aliquote pari a 500µl.

Il tutto è conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

Analisi del polimorfismo IL-6 (SNP -174G/C)

Il polimorfismo -174G/C è stato studiato tramite la metodica RFLP-PCR. Il DNA dei soggetti in studio è stato estratto da leucociti isolati da sangue periferico seguendo il protocollo standard del kit di purificazione tramite colonna, DNA Minikit (Qiagen, Cologne, Germany).

La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando un termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) secondo un programma comprendente un'iniziale denaturazione di 5 minuti a 95 °C, 25 cicli di denaturazione (95 °C X1min), appaiamento dei primer (63 °C X1min), estensione (72 °C X2min) e una fase di estensione finale a 72 °C per 10 minuti. La miscela di reazione comprende: 2,5 mM MgCl₂, 9,9 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton-X100, 200 µM dNTPs, 1U of *Taq* DNA polimerasi, e 0,2 µM di ciascun primer (F 5'- CAGAAGAAGTAAGATGAC – 3' R 5'-GCTGGGCTCCTGGAGGGG – 3').

L'amplicone, ovvero il prodotto di amplificazione della lunghezza di 611 bp, è stato poi digerito utilizzando l'enzima di restrizione SfaN1 (Fermentas), 3 unità/reazione, per 3h a 37 °C .

La genotipizzazione è stata, quindi, determinata attraverso la visualizzazione dei prodotti di digestione su gel d'agarosio al 2%, marcato con bromuro d'etidio, mediante un trans-illuminatore UV (Biorad).

I genotipi GG, GC e CC hanno rispettivamente bande della taglia di 400bp/200bp, 600bp/400bp/200bp e 600 bp.

Analisi del polimorfismo di IL-15R α (SNP IV S-5)

La variante IVS-5 della subunità alfa del recettore della IL-15 è localizzata nella regione compresa fra l'esone e l'introne 5, e consiste nella sostituzione di un'adenina (A) con una guanina (G) (SNP accession rs 3136618).

Il DNA dei soggetti in studio è stato estratto da leucociti isolati da sangue periferico seguendo il protocollo standard del kit di purificazione tramite colonna, DNA Minikit (Qiagen, Cologne, Germany).

La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando un termocilatore (Mastercycler personal, Eppendorf) secondo un programma comprendente un'iniziale denaturazione di 4 minuti a 94 °C, 34 cicli di denaturazione (94 °C X1min), appaiamento dei primer (50 °C X1min), estensione (72 °C X1min) e una fase di estensione finale a 72 °C per 10 minuti. La miscela di reazione comprende: 2,5 mM MgCl₂, 9,9 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton-X100, 200 μ M dNTPs, 1U of Taq DNA polimerasi, e 0,2 μ M di ciascun primer 5'-ATCTGATGGAGGCCTTCTGAG-3' and 5'-GCTTCATGAGGAACTAGGACC-3').

L'amplicone, è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione HpaII (Fermentas) secondo il metodo descritto da Riechman et al., ed ha permesso l'identificazione dei 3 alleli, l'omozigote AA, l'eterozigote AG e l'omozigote GG su gel d'agarosio.

Analisi del polimorfismo IL-1ra (VNTR introne2)

Il gene dell'antagonista del recettore (ra) per IL-1 è caratterizzato da una VNTR (variable numbers of a tandem repeats) a livello dell'introne 2 che viene studiata

tramite semplice PCR, in base alla grandezza del frammento che si ottiene dall'amplificazione a ridosso di tale regione.

Il DNA dei soggetti in studio è stato estratto da leucociti isolati da sangue periferico seguendo il protocollo standard del kit di purificazione tramite colonna, DNA Minikit (Qiagen, Cologne, Germany).

La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando un termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) secondo un programma comprendente un'iniziale denaturazione di 1 minuti a 96 °C, 30 cicli di denaturazione (94 °C X1min), appaiamento dei primer (60 °C X1min), estensione (70 °C X1min) e una fase di estensione finale a 72 °C per 10 minuti. La miscela di reazione comprende: 2,5 mM MgCl₂, 9,9 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,1% Triton-X100, 200 µM dNTPs, 1U of Taq DNA polimerasi, e 0,2 µM di ciascun primer 5'-CTCAGTAACACTCTCTAT-3' and 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3').

La lunghezza dell'amplicone ottenuto individua il genotipo. 240 bp, 325 bp, 410 bp, 500 bp e 595 bp rappresentano rispettivamente gli alleli A1, A2, A3, A4 e A5, caratterizzati da 2, 3, 4, 5 e 6 copie della sequenza ripetuta.

Determinazione citochine infiammatorie circolanti:

La concentrazione plasmatica delle citochine IL-6, IL-1alfa, IL-1beta, IL-1ra e IL-15, è stata determinata in duplicato secondo metodica ELISA utilizzando un kit commerciale ad alta sensibilità per ciascuna citochina (BD-Biosource). Il saggio

biochimico è stato eseguito rispettando le indicazioni del protocollo standard di ciascun Kit. Il limite minimo di misurazione è stato 0,2 pg/mL.

3.9 ELABORAZIONE STATISTICA

L'elaborazione statistica è stata effettuata utilizzando il programma SPSS (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Per la misura della variabilità dei parametri è stata utilizzata la deviazione standard ed i valori sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$. Per il confronto tra i gruppi è stato utilizzato il test di significatività di Student (t test). I parametri relativi alla composizione corporea sono stati comparati fra i gruppi attraverso il metodo One Way ANOVA (ANalysis Of VAriance), test parametrico per la disuguaglianza delle medie delle popolazioni.

Le differenze sono state considerate significative quando il valore di $P < 0,05$.

CAPITOLO 4

RAZIONALE DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è stato quello di caratterizzare dal punto genetico e biochimico una popolazione di soggetti affetta dalla sindrome che va sotto il nome di Normal Weight Obese (NWO). Questi soggetti sono caratterizzati da un precoce stato infiammatorio, legato all'eccesso di tessuto adiposo, dunque quanto questo eccesso di grasso corporeo sia in relazione al loro stato genotipico.

Sono state prese in considerazione tre varianti genotipiche a carico di tre differenti citochine IL-1, IL-6 e IL-15 descritte in letteratura e correlate a stati infiammatori, in particolare:

- il polimorfismo dell'antagonista del recettore di IL-1 (IL-1Ra)
- Il polimorfismo -174G/C a livello del promotore del gene di IL-6
- Il polimorfismo del recettore alpha di IL-15 (IL-15R α)

Questi parametri sono stati poi messi in relazione ai livelli circolanti di IL-1, IL-6 e IL-15, alla composizione corporea ed agli indici di rischio cardiovascolare, come possibili indicatori prognostici significativi del rischio di patologie cardiovascolari e sindrome NWO.

Sono stati valutate le differenze esistenti tra i vari gruppi in termini di percentuale di Fat Free Mass, percentuale di Fat Mass e indici lipidici associati ad un aumentato

rischio cardiovascolare ed il ruolo fisiopatologico dei polimorfismi nei soggetti NWO, messi a confronto con una popolazione normopeso oppure con una popolazione di soggetti pre-obesa-obesa.

Obiettivi principali dello studio sono stati l'individuazione di differenze esistenti tra i vari gruppi riguardo la loro composizione corporea, ma anche e soprattutto sotto l'aspetto metabolico e biochimico al fine di individuare se esistono delle variabili, tra quelle esaminate, che possano essere ipotizzate come indicatori precoci della nuova sindrome descritta.

Individuare quali siano le modificazioni più precoci che si verificano nei soggetti che svilupperanno la sindrome De Lorenzo consentirebbe di orientare la ricerca sulla cura di tali fattori al fine di evitare l'instaurarsi della sindrome o almeno di ritardarne la comparsa e progressione.

CAPITOLO 5

RISULTATI

5.1 RISULTATI POLIMORFISMO IL-1Ra

Sul totale dei soggetti è stato selezionato un sottogruppo di 110 donne suddivise in tre gruppi in funzione del loro valore di BMI e della percentuale di massa grassa (%FM). Il primo gruppo è costituito da 30 soggetti non obesi con valore di BMI <25 kg/m² (intervallo di normalità 18÷25 kg/m²) e FM% <30%. Il secondo gruppo di 40 soggetti classificabile come NWO con il valore di BMI <25 kg/m² e FM% >30%. Infine il terzo gruppo sempre di 40 soggetti dichiarato pre-obeso-obeso con il valore di BMI >25 kg/m² e FM% >30%. Nessun soggetto di sesso maschile è classificabile come NWO con valori di BMI <25 kg/m² e FM% >30%, tuttavia sono comunque stati inclusi nel numero totale di soggetti e utilizzati nell'analisi della frequenza allelica di IL-1Ra. La distribuzione genotipica del singolo polimorfismo IL-1Ra è stata quindi valutata su 150 soggetti di cui 110 donne e 40 uomini. La frequenza osservata è sovrapponibile ai dati di letteratura noti ed in particolare: 80.7% di A1; 16% A2; 3.3% A5. Le frequenze alleliche A3 e A4 non sono state evidenziate nella popolazione studiata.

I parametri descrittivi della composizione corporea del gruppo studiato sono riportati nella tabella 1. I valori di età, altezza, rapporto vita/fianchi risultano simili nei tre gruppi studiati. Al contrario risultano significative differenze tra i gruppi nei valori di

BMI, FM, %FM, free fat mass (FFM), percentuale di free fat mass (FFM%), vita, fianchi e peso. Nella tabella 2 sono riportate alcune variabili ematochimiche. Tra i parametri presi in considerazione non sono state osservate differenze significative nei valori della glicemia a digiuno (FG) così come nel profilo lipoproteico plasmatico con l'eccezione del HDL-chol e del rapporto TC/HDL nel gruppo NWO se confrontato con le non-obese (vedi Tabella 2). Il gruppo classificato come pre-obeso-obeso presenta alti valori di TC, TG/HDL, TC/HDL, LDL/HDL and hs-CRP se confrontato con le non-obese e le NWO.

Per la valutazione del contributo del polimorfismo di IL-1Ra sul fenotipo NWO sono state confrontate le frequenze alleliche nei diversi soggetti suddivisi utilizzando valori di soglia di BMI 25 kg/m^2 e FM 30%. In accordo con questa soglia nessuno dei soggetti di sesso maschile è classificabile come NWO, ma solo come non obeso o pre-obeso-obeso. Mentre per le donne è possibile suddividere nei tre gruppi: non-obese, NWO e pre-obese-obese. Nella figura 1 quindi sono riportate le frequenze alleliche di IL-1Ra nel gruppo di donne studiate. Come si osserva in nessuno dei tre gruppi sono presenti A3 e A4 mentre la frequenza A1 non risulta differente nei tre gruppi (80% non-obese; 80% NWO e 82.5% nelle pre-obese-obese). Differenze significative sono state notate per l'allele A2: NWO = 12.5% dei soggetti; pre-obese-obese (17.5%); non-obese (6.7%). L'allele A5 sembra presente esclusivamente nelle non-obese (13.3%) e nelle NWO (7.5%).

I livelli plasmatici di IL-1 α e IL-1 β (Figura 2) nelle NWO sebbene inferiori a quelli osservati nelle pre-obese-obese, risultano comunque significativamente più elevati

rispetto ai soggetti non obesi ($P < 0,05$), ponendosi le NWO in una situazione intermedia tra le non-obese e le pre-obese-obese. I livelli plasmatici di citochine sono stati poi messi in relazione alla differente presenza dell'allele A2 nei tre gruppi. Come riportato nella tabella 3 le maggiori differenze si evidenziano per i livelli di IL-1 β ; in modo particolare nei due sottogruppi NWO e pre-obese-obese è presente un significativo aumento della concentrazione di IL-1 β nel gruppo A2(+) rispetto al gruppo A2(-). Al contrario non si notano grosse differenze per quanto riguarda i livelli plasmatici di IL-1 α tra A2(+) e A2(-) nei tre gruppi studiati.

5.2 RISULTATI POLIMORFISMO -174G/C SUL PROMOTORE GENICO DI IL-6

Le caratteristiche antropometriche e i dati di biochimica clinica sono riportati in Tabella 4. I soggetti NWO si differenziano rispetto alle normopeso e alle obese ponendosi in una posizione intermedia in termini di valori di FM%, FFM%, % grasso addominale, livelli di hs-CRP e trigliceridi.

Oltre alle già citate differenze il gruppo delle OB presenta inoltre alti livelli di insulina a digiuno, hs-CRP, colesterolo e LDL-chol e trigliceridi rispetto al gruppo delle NW.

Significative differenze sono state trovate nella distribuzione del grasso addominale (FM% abdominal) ponendo a confronto le NWO con le NW e le OB (NW vs. NWO, $P < 0.001$; NWO vs. OB, $P < 0.001$).

Sempre in Tabella 4 si può osservare come i livelli plasmatici di IL-6 nelle NWO prese nel loro insieme, siano aumentati (8.10 ± 3.80 pg/mL) rispetto alle NW (5.45 ± 1.44 pg/mL) risultando confrontabili a quelli delle OB (7.61 ± 3.73 pg/mL).

Il polimorfismo -174G/C presente sul promotore genico di IL-6 mostra di essere in grado di modulare i livelli plasmatici di questa citochina infatti nella popolazione NWO e OB omozigote G/G i livelli di IL-6 risultano significativamente più elevati rispetto ai soggetti NW (Figura 3). Il genotipo G/C appare influenzare in misura minore i livelli sierici di IL-6 nei tre gruppi, mentre al contrario il genotipo C/C determina un abbassamento di IL-6 nelle NWO e OB (rispettivamente: 2.63 ± 1.30 e 2.55 ± 1.80 pg/ml) rispetto alle NW (4.63 ± 0.80 pg/ml). Se poniamo in relazione le due variabili, massa grassa (FM%) e livelli sierici di IL-6 queste sembrano significativamente correlate tra di loro solo nei due genotipi G/G e C/C mentre per il genotipo eterozigote G/C non sono state osservate correlazioni significative (Figura 4).

Le varianti genotipiche si sono dimostrate in grado di modulare anche i valori del parametro HOMA-IR nei tre gruppi di soggetti, NW NWO e OB. In particolare le maggiori differenze sono state osservate tra i due genotipi G/G e C/C nelle donne obese (OB, Figura 5). Nel gruppo delle NWO il genotipo G/G è il solo in grado di differenziare in modo significativo i valori di HOMA-IR rispetto alle altre due varianti G/C e C/C (Figura 5). A completare il quadro, risultano correlati positivamente i valori di HOMA-IR e i livelli di IL-6 come riportato in Figura 6, sebbene la significatività si evidenzia solo nel sottogruppo caratterizzato dal genotipo G/G.

5.3 RISULTATI POLIMORFISMO DI IL-15Rá

Come per i precedenti polimorfismi anche in questo caso sono stati raccolti i dati descrittivi della popolazione di sesso femminile e riportati nella Tabella 5, in totale 108 soggetti, suddivisi in questo caso nei due fenotipi: Class 1, pre-obese-obese (72 soggetti); Class 2, Normal Weight Obese (NWO, 36 soggetti).

Si evidenziano tra queste due popolazioni evidenti differenze in quasi tutti i parametri studiati, in modo particolare in termini di BMI, % grasso addominale, circonferenza vita e parametri di rischio cardiovascolare quali, trigliceridi, colesterolo, LDL e HDL.

L'analisi genotipica sui siti polimorfici di IL-15rá studiati indica una significativa differenza nella distribuzione allelica per il sito polimorfico INTRO5 nelle due classi di donne (Figura 7); in particolare le donne di classe 2 (NWO) mostrano un'alta incidenza dell'allele A rispetto a quelle di classe 1 (pre-obese-obese). Simile è risultata la variazione allelica anche per il sito EXO4 anche se non mostra una statistica significativa.

Nella Figura 8 è mostrata la differenza tra le due classi di soggetti in funzione della distribuzione aplotipica di IL-15rá che risulta particolarmente significativa negli aplotipi EXO4-INTRO5 e EXO4-EXO7. Da notare che la variante A/A è risultata quella più rappresentata, in modo statisticamente significativo, nei soggetti NWO (Class 2) rispetto alle pre-obese-obese (Class 1) in due distinti aplotipi i.e.: l'aplotipo EXO7-INTRO5 e l'aplotipo EXO4-EXO7 (vedi Figura 8).

Se vengono raggruppati tutti gli aplotipi caratterizzati dal polimorfismo comune A/A per IL-15r α , come mostrato in Figura 9, l'analisi odds ratio mostra una costante maggiore proporzione dei portatori di questo polimorfismo nei soggetti appartenenti alla classe 2 (NWO) rispetto alla classe 1 (pre-obese-obese).

Quindi sulla base dei dati ottenuti è stato analizzato il possibile effetto funzionale del polimorfismi comuni nella IL-15r α sui livelli plasmatici di IL-15 limitatamente agli aplotipi EXO7-INTRO5 e EXO4-EXO7. Come riportato nella Figura 10 nei soggetti dove è prevalente l'aplotipo A/A i livelli di IL-15 circolante si mantengono a livelli più bassi rispetto agli altri genotipi comuni sebbene queste differenze non presentano una significatività statistica degna di nota.

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE

Il presente studio mostra una prima caratterizzazione della nuova sindrome NWO o sindrome di De Lorenzo caratterizzata da valori di peso e BMI nella norma ma parametri alterati di composizione corporea caratteristici di soggetti con obesità conclamata. I fattori ambientali hanno un ruolo chiave nell'eziologia dell'obesità, tuttavia il contributo del profilo genetico dei soggetti risulta estremamente significativo e saranno sicuramente necessarie ulteriori e più approfondite indagini biologico molecolari sul ruolo delle citochine e del loro polimorfismo nella sindrome NWO. I dati riportati mostrano infatti come i polimorfismi a carico di tre differenti citochine, IL-1Ra, il promotore genico di IL-6 e IL-15R α , siano in grado di modulare la composizione corporea, i parametri metabolici ed ematochimici di una popolazione di soggetti caratterizzati dalla sindrome NWO.

Nel loro insieme i risultati ottenuti permettono di tracciare per i soggetti NWO un profilo contraddistinto da un precoce stato infiammatorio. In particolare nei soggetti NWO il polimorfismo a carico della IL-1Ra si caratterizza per una significativa maggiore frequenza, rispetto ai soggetti normopeso dell'allele A2 (Figura 1; NWO=12.5% vs. non-obesi=6.7%); poco comune nella popolazione generale ma descritto in letteratura come associato ad uno stato infiammatorio cronico in molteplici condizioni patologiche, comprese malattie autoimmuni e cancro. A

conferma di quanto sopra anche i livelli circolanti di IL-1 α e IL-1 β nei soggetti NWO si correlano alla presenza di una maggiore massa grassa, in quanto risultano superiori a quelli misurati nei normopeso e vicini nei valori di concentrazione a quelli dei soggetti soprappeso e obesi.

Più complessa appare l'interpretazione del dato a riguardo del polimorfismo -174 G/C presente sul promotore genico di IL-6. Nell'insieme della popolazione NWO infatti i livelli circolanti di IL-6 risultano più elevati rispetto a quelli presenti nei normopeso (Tabella 4) tuttavia il polimorfismo -174G/C presente sul promotore genico di IL-6 mostra di essere in grado di modulare i livelli plasmatici di questa citochina. Il genotipo C/C è associato ad una ridotta concentrazione plasmatica di IL-6 nella popolazione NWO e OB rispetto ai soggetti NW (Figura 3), in accordo con dati di letteratura che indicano una ridotta attività trascrizionale di IL-6 per il genotipo C/C. Inoltre se si pone in relazione la massa grassa (FM%) e i livelli plasmatici di IL-6 queste sembrano significativamente correlate tra di loro solo nei genotipi omozigoti G/G e C/C mentre per il genotipo eterozigote G/C non sono state osservate correlazioni significative (Figura 4). Tutto questo a sostegno che l'analisi della distribuzione dei polimorfismi genetici nella popolazione in relazione a particolari stati patologici devono necessariamente affiancarsi alle metodologie ematochimiche convenzionali e acquisire un ruolo di primo piano nella definizione degli indicatori precoci di malattia.

Una ulteriore conferma a questa impostazione emerge dallo studio effettuato sul polimorfismo a carico della IL-15R α . I soggetti NWO presentano una distribuzione

preferenziale della variante allelica A/A e questa si correla dal punto di vista funzionale ad una ridotta concentrazione dei livelli circolanti di IL-15R α rispetto ai soggetti obesi (Figura 10).

Il caso NWO riportato vuole essere infatti un primo tentativo di approccio interdisciplinare allo studio delle complesse interazioni dei nutrienti sul genoma e queste osservazioni sembrano indicare che l'attivazione di specifici cluster genici possa essere alla base dell'aumento del rischio di malattia. Risulta altresì evidente che alla luce di quanto esposto lo sviluppo di metodologie quali la nutrigenetica, la nutrigenomica, la proteomica e la metabolomica dovrà portare in un prossimo futuro una loro utilizzazione in campo clinico. Questa ipotesi, già oggi suffragata da importanti segnali positivi al riguardo, appare realizzabile sicuramente in senso diagnostico/preventivo, utilizzando i risultati al fine di agire in senso preventivo su soggetti con costituzionalità alterata ed in senso diagnostico affiancando queste metodiche nella routine clinica ad altre metodiche consolidate nel tempo ma con una accuratezza ed una affidabilità inferiore. Oltre a ciò queste evoluzioni metodologiche permetteranno di impostare una terapia nutrizionale mirata alla singola situazione ed al singolo paziente adattandola attraverso un follow up continuo eseguito con le medesime procedure. Infine sarà possibile effettuare controlli a distanza su ogni paziente per mettere in atto un monitoraggio continuo sia per situazioni patologiche costituzionali sia per verificare il mantenimento degli effetti positivi ottenuti dalla terapia nutrizionale.

TABELLE

Tabella 1. Composizione corporea nel gruppo di donne studiate per il polimorfismo IL-1Ra suddivise in: normopeso NW, NWO e Preobese-obese.

	Gruppi		
	NW (n=30)	NWO (n=40)	Pre-obese-obese (n=40)
Age (years)	25.25 ± 5.90	26.86 ± 6.32	28.88 ± 5.91
Body weight (Kg)	51.90 ± 4.27	59.25 ± 5.32	77.70 ± 10.88*
Height (cm)	164.96 ± 7.48	160.90 ± 5.63	160.35 ± 6.05
Waist (cm)	65.31 ± 3.89	74.00 ± 8.15**	86.62 ± 7.97*
Hip (cm)	85.86 ± 12.40	99.42 ± 7.16**	109.93 ± 8.71*
W/H	0.78 ± 0.14	0.74 ± 0.04	0.79 ± 0.06
BMI	19.51 ± 1.59	22.67 ± 1.48	30.00 ± 3.21*
Lean (Kg)	36.57 ± 3.04	35.54 ± 3.10	38.67 ± 6.18
FM (Kg)	12.19 ± 1.95	20.85 ± 3.64**	35.34 ± 8.11*
FFM (Kg)	39.36 ± 3.15	38.40 ± 3.21	42.35 ± 6.06*
FM %	23.58 ± 2.66	35.04 ± 3.4**	45.14 ± 6.33*
FFM%	76.42 ± 2.66	64.96 ± 3.90**	54.86 ± 6.33*

Abbreviazioni: BMI, Body Mass Index; FM, Fat Mass; FFM, Fat Free Mass; FM%, Fat mass in percentuale; FFM%, Fat Free Mass in percentuale; W/H= Rapporto vita/fianchi. I dati sono espressi come media ± SD. La statistica è stata condotta secondo il test Kruskal-Wallis's. Differenze con valori di $P < 0.05$ sono considerate significative. *) Pre-Obese Obese vs NWO,; **) NWO vs Non obese.

Tabella 2. Parametri metabolici nei gruppi di donne studiate per polimorfismo IL-1Ra suddivise in: normopeso NW, NWO e Preobese-Obese.

	1) Gruppi		
	NW (n=30)	NWO (n=40)	Pre-obese-obese (n=40)
FG (mmol/L)	5.63 ± 0.21	5.55 ± 0.41	5.72 ± 0.55
TG(mmol/L)	0.74 ± 0.25	0.85 ± 0.33	1.2 ± 0.38
TC(mmol/L)	5.72 ± 1.28	5.84 ± 0.88	6.93 ± 1.15*
HDL chol(mmol/L)	1.45 ± 0.25	1.40 ± 0.31**	1.20 ± 0.27*
LDL chol (mmol/L)	3.10 ± 1.09	3.24 ± 0.69	3.50 ± 2.04
TC/HDL ratio	3.27 ± 0.71	4.31 ± 0.79**	5.13 ± 1.31*
TG/LDL ratio	0.51 ± 0.17	0.62 ± 0.24	0.82 ± 0.31*
LDL/HDL ratio	2.16 ± 0.72	2.49 ± 0.72	3.00 ± 1.55*
hs-CRP (mg/L)	0.5 ± 0.10	0.9 ± 0.40	1.9 ± 0.30*

Abbreviazioni: FG, Fasting Glucose; TG, Triglycerides; TC, Total Cholesterol; HDL-chol, High Density Lipoprotein-cholesterol; LDL-chol, Low Density Lipoprotein-cholesterol; hs-CRP, high-sensitivity C-Reactive Protein. I valori sono espressi come media ± SD. La statistica è stata condotta secondo il test Kruskal-Wallis's. Differenze con valori di $P < 0.05$ sono considerate significative. *) Pre-Obese Obese vs NWO, $P < 0.01$; **) NWO vs Non obese.

Tabella 3. Livelli circolanti di IL-1 α and IL-1 β nei soggetti portatori e non dell'allele A2 nei tre gruppi studiati.

	IL-1 α		IL-1 β	
	A2 (-)	A2(+)	A2(-)	A2(+)
NW	14.70 \pm 0.90 (n=28)	12.80 \pm 1.90 (n=2)	5.81 \pm 1.80 (n=28)	7.4 \pm 0.90 (n=2)
NWO	24.87 \pm 4.21 ^c (n=35)	24.74 \pm 4.72 ^e (n=5)	9.8 \pm 2.42 (n=35)	19.9 \pm 4.22 ^a (n=5)
Pre-obese- obese	33.05 \pm 5.90 ^d (n=33)	32.40 \pm 4.30 ^f (n=7)	12.34 \pm 3.70 (n=33)	17.00 \pm 3.80 ^b (n=7)

Abbreviazioni: NW, normopeso; A2(-), non portatore di A2; A2(+), portatore di A2. I valori sono espressi come media \pm SD. La statistica è stata condotta secondo il test Kruskal-Wallis's. Differenze con valori di $P < 0.05$ sono considerate significative: a) NWO A2(-) vs. NWO A2(+), $P < 0.001$; b) Pre-Obese-Obese A2(-) vs. Pre-Obese-Obese A2(+), $P < 0.001$; c) Non-Obese A2(-) vs. NWO A2(-), $P < 0.05$; d) Non-Obese A2(-) vs. Pre-Obese-Obese A2(-), $P < 0.01$; e) Non-Obese A2(+) vs. NWO A2(+), $P < 0.05$; f) Non-Obese A2(+) vs. Pre-Obese-Obese A2(+), $P < 0.01$.

Tabella 4. Parametri di composizione corporea nel gruppo di donne studiate per il polimorfismo -174G/C nel promotore genico di IL-6, suddivise in: normopeso NW, NWO e pre-obese-obese.

	NW (n=50)	NWO (n=50)	Pre-obese-obese (n=50)
BMI (Kg/m ²)	19.49±1.4	22.84±1.4	29.97±3.2*
FM%	23.99±2.4	35.30±4.0**	43.26±5.5*
FFM%	76.01±3.5	64.7±3.1**	54.62±4.7*
FAT abdominal %	19.34±6.9	37.36±4.8**	55.86±7.3*
TG (mg/dl)	69.15±5.9	84.92±3.3**	122.34±12.4*
TC (mg/dl)	177.73±9.3	174.05±10.3	238.06±20.7*
HDL (mg/dl)	64.28±4.9	62.0±3.5	76.54±8.7
LDL (mg/dl)	93.50±0.6	98.02±5.8	139.74±14.1*
hs-CRP	0.59±0.1	0.9±0.1**	2.00±0.3*
FG (mg/dL)	91.66±4.6	91.61±3.9	96.22±3.4
FI (μIU/mL)	7.05±1.7	6.90±1.3	10.8±2.0*
HOMA-IR	1.34±0.3	1.57±0.5	2.13±0.8*
IL-6 (pg/mL)	5.45±1.4	8.10 ± 3.8**	7.61 ± 3.7*

Abbreviazioni: BMI, Body Mass Index; FM%, percentuale di massa grassa; FFM%, percentuale di massa libera da grasso; TG, Trigliceridi; TC, Total Cholesterol; High Density Lipoprotein-cholesterol; Low Density Lipoprotein-cholesterol; hs-CRP, high-sensitivity C-Reactive Protein; FG, Fasting Glucose; FI, Fasting insulin; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance; IL-6, fasting plasma IL-6. I dati sono espressi come media ± SD. La statistica è stata condotta secondo il *post hoc* Tukey's test. Differenze con valori di $P < 0.05$ sono considerate significative. *) $P < 0.05$, obese vs. NWO, obese vs. non-obese; **) $P < 0.05$, NWO vs. non obese.

Table 5. Caratteristiche descrittive e valori di ematochimica nel gruppo di donne pre-obese-obese e NWO studiate per il polimorfismo di IL-15Rá.

	OB (n=72)	NWO (n=36)	Sezione 1.02 (OB vs. NWO)	P
BMI (Kg/m ²)	29.9 ± 3.2	22.8 ± 1.4	<0.001	
FM%	43.3 ± 5.5	35.3 ± 4.0	<0.01	
FFM%	54.6 ± 4.7	64.7 ± 3.1	<0.01	
FAT abdominal %	55.9 ± 7.3	37.4 ± 4.8	<0.001	
Waist (cm)	90.2 ± 13.6	71.8 ± 4.8	<0.001	
Hip (cm)	108.7 ± 23.1	96.1 ± 8.1	<0.01	
VO ₂ (ml)	199.7 ± 48.2	174.5 ± 47.3	<0.05	
VCO ₂ (ml)	167.7 ± 42.9	149.3 ± 28.4	>0.05	
RMR (kcal)	1442.0 ± 317.1	1255.2 ± 348.0	<0.05	
TG (mg/dl)	122.3 ± 12.4	84.9 ± 3.3	<0.001	
TC (mg/dl)	238.1 ± 20.7	174.1 ± 10.3	<0.01	
HDL-chol (mg/dl)	76.5 ± 8.7	62.0 ± 3.5	>0.05	
LDL-chol (mg/dl)	139.7 ± 14.1	98.0 ± 5.8	<0.01	
FG (mg/dL)	96.2 ± 3.4	91.6 ± 3.9	>0.05	

Abbreviazioni: OB, pre-obese-obese; NWO, normal weight obese; BMI, Body mass index; FM%, percentuale Fat Mass; FFM%, percentuale Fat Free Mass; WAIST = circonferenza vita; HIP = circonferenza fianchi; RMR = Resting Metabolic Rate; VO₂ = consume di O₂; VCO₂ = produzione di CO₂; TG, trigliceridi; TC, colesterolo totale; HDL, colesterolo high density lipoprotein; LDL, colesterolo low density lipoprotein; FG, glicemia.

FIGURE

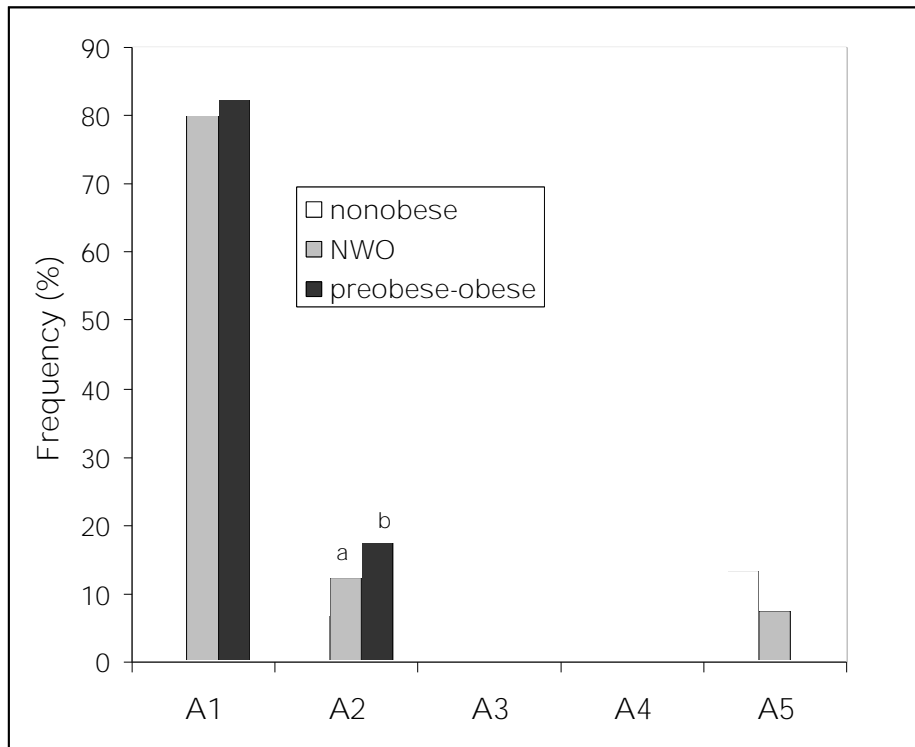


Figura 1. Frequenza degli alleli di IL-1ra nel gruppo di donne studiate. Le frequenze alleliche (A1, A2, A3, A4 e A5) sono state studiate nelle donne appartenenti al gruppo delle normopeso non-obese (n=30), NWO (n=40) e pre-obese-obese (n=40). Le frequenze sono riportate in percentuale (%). Il confronto tra i gruppi è stato analizzato usando il chi quadro e il test di Fisher's. Differenze con valore di $P < 0.05$ sono considerate significative: ^a non-obese vs. NWO, $P < 0.001$; ^b non-obese vs. pre-obese-obese $P < 0.001$.

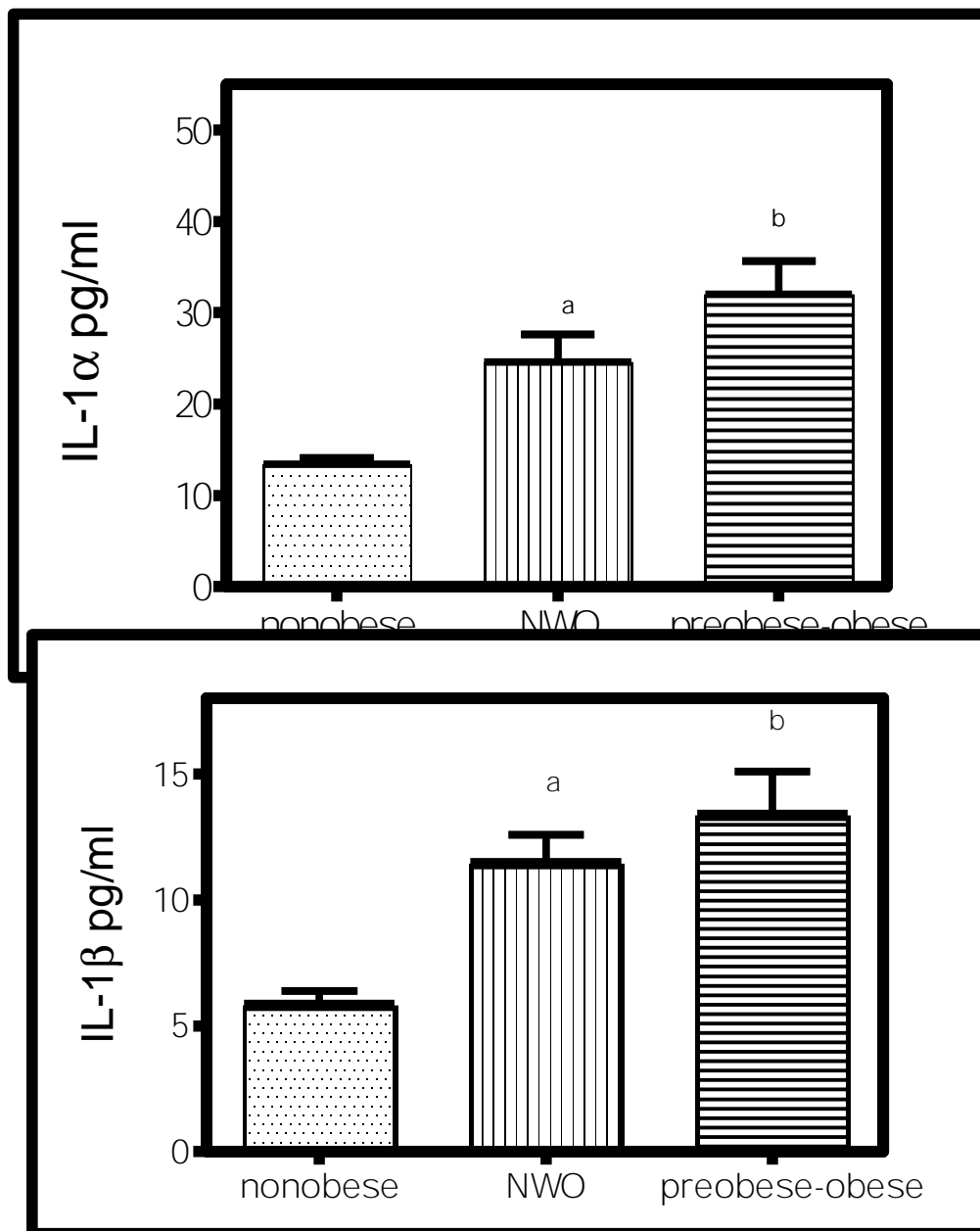


Figura 2. Livelli plasmatici di IL-1 α e IL-1 β nella popolazione di donne studiate suddivise in non-obese (n=30), NWO (n=40) and pre-obese-obese (n=40).

I valori rappresentano la media + SD. L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test di Kruskal-Wallis's. Le differenze con valori di $P < 0.05$ sono considerate significative: ^a) nonobese vs. NWO $P < 0.05$; ^b) nonobese vs. preobese-obese $P < 0.01$.

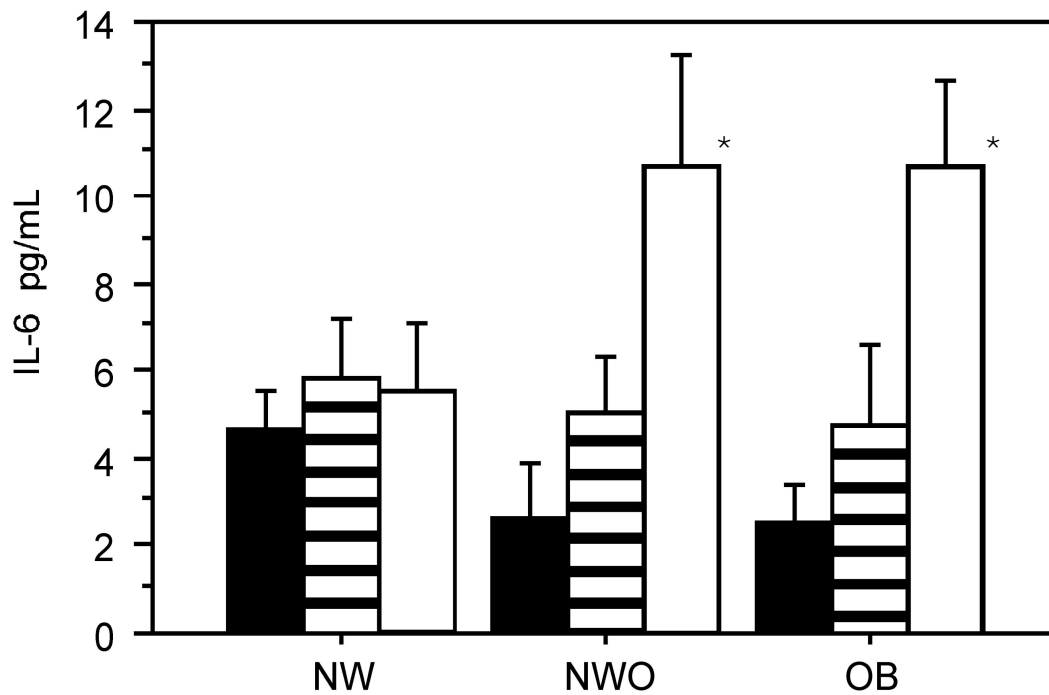


Figura 3. Concentrazione plasmatica di IL-6 in soggetti di sesso femminile normopeso (NW), NWO e obeso (OB) in funzione del genotipo: CC (), CG (▨) e GG (□). I dati sono espressi come valore medio +SD. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA e test post-hoc di Fisher.

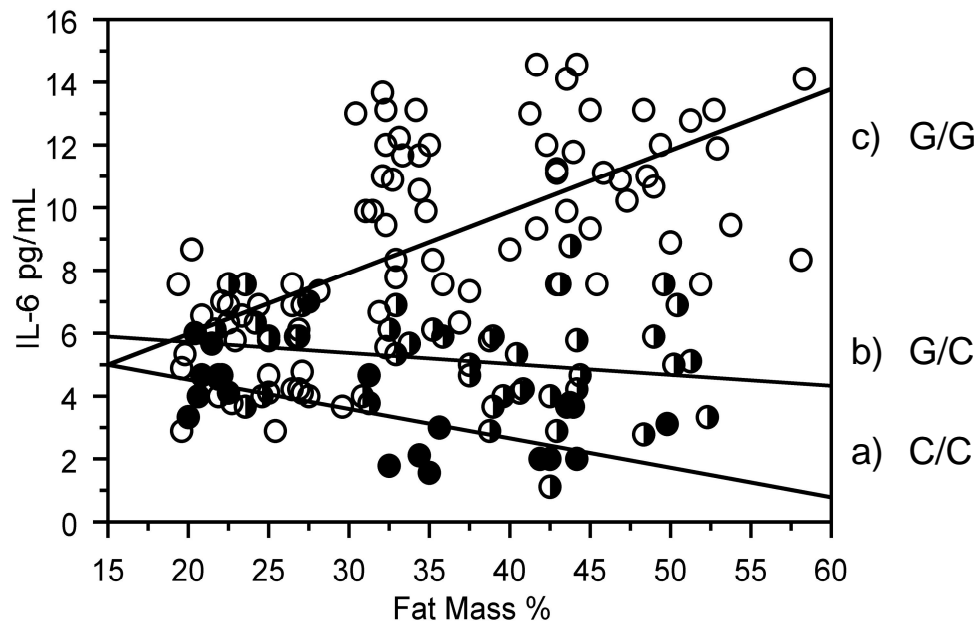


Figura 4. Regressione lineare tra i livelli plasmatici di IL-6 e i valori in percentuale di massa grassa nei soggetti studiati in accordo al loro genotipo:) GG, $R^2 = 0.397$; $P < 0.001$;) CG, $R^2 = 0.041$, $P = NS$;) CC, $R^2 = 0.459$; $P < 0.01$).

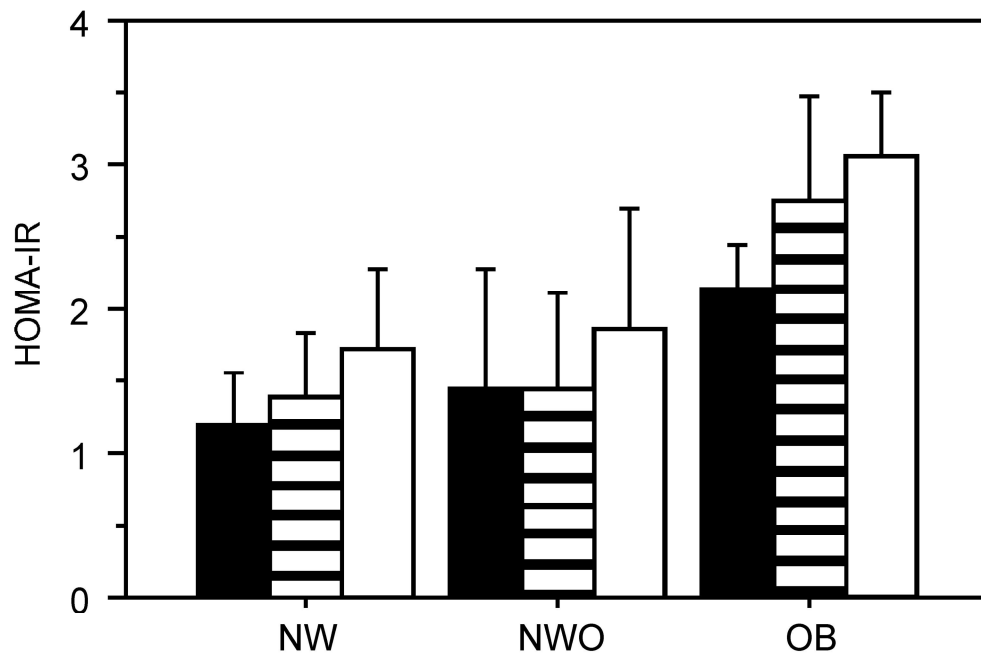


Figura 5. Valori HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance) nei soggetti normopeso (NW), NWO e pre-obesi-obesi (OB) riportati in funzione del genotipo: CC (■), CG (▨) e GG (□). I dati sono espressi come valore medio +SD. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA e test post-hoc di Fisher.

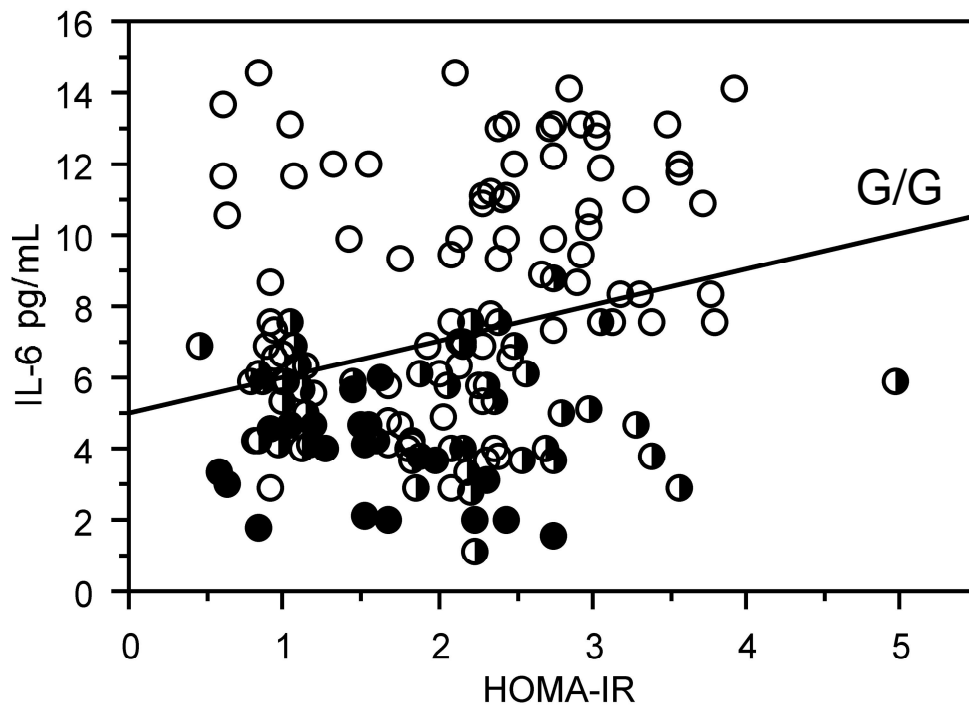


Figura 6. Regressione lineare tra i livelli plasmatici di IL-6 e i valori di HOMA-IR nei soggetti studiati in accordo al loro genotipo: ○) GG, $R^2 = 0.067$; $P < 0.05$; ◐) CG; ●) CC.

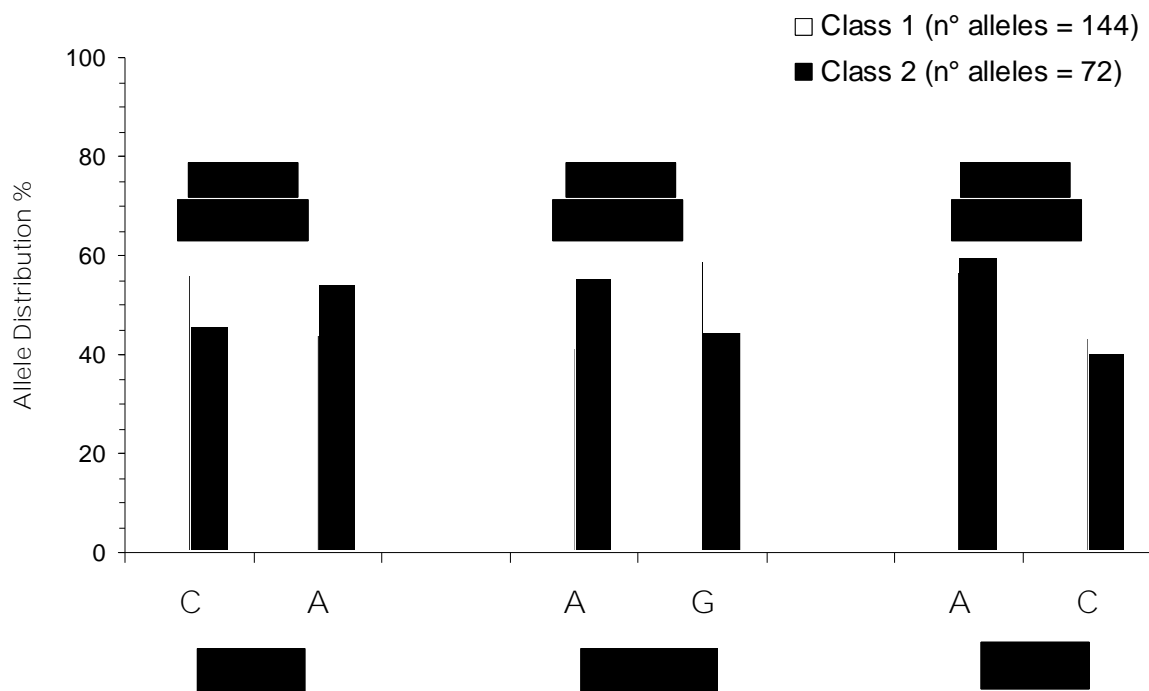


Figura 7. Percentuale della distribuzione allelica relativa al polimorfismo di IL-15r α in relazione alla classificazione clinica. Abbreviazioni usate: class 1, soggetti pre-obesi-obesi; class 2 soggetti NWO. EXO4, esone 4, variante C / A; INTRO5, esone 5 introne-esone–exon border, variant A / G; EXO7, esone 7, variante A / C.

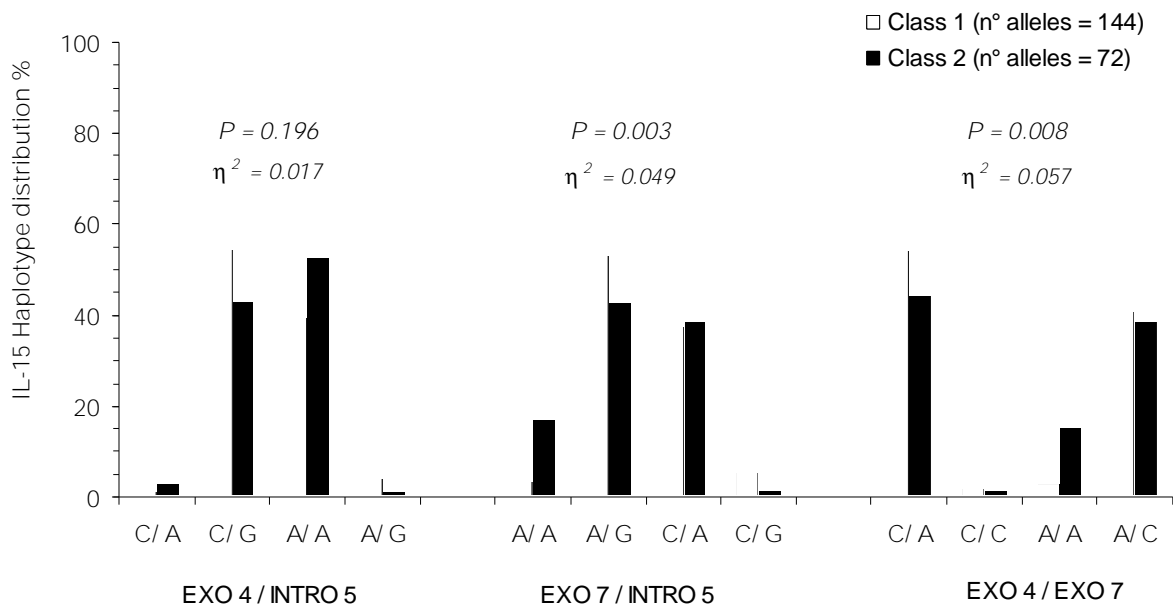


Figura 8. Distribuzione % dell'aplotipo IL-15 α in relazione alla classificazione clinica. Abbreviazioni: Class 1, donne pre-obese-obese; Class 2, donne NWO; EXO4, esone 4, variante C / A; INTRO5, esone 5 introne-esone-exon border, variant A / G; EXO7, esone 7, variante A / C.

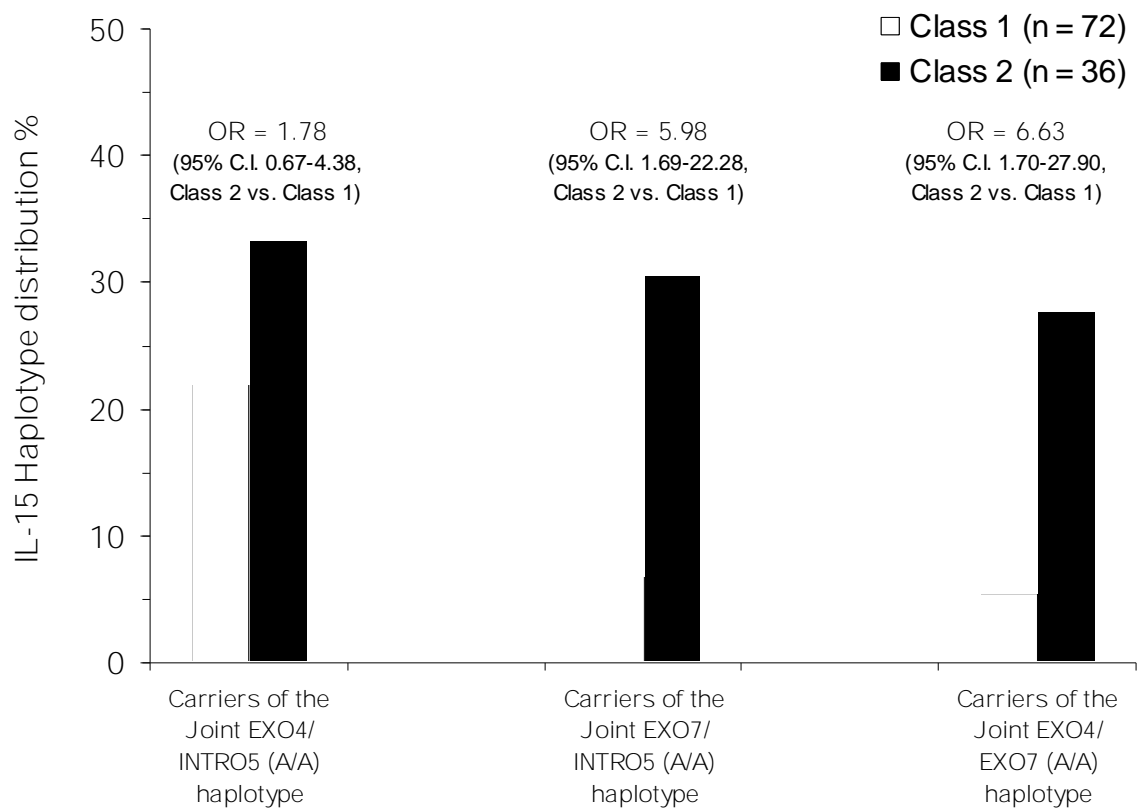


Figura 9. Analisi Odds ratio sul polimorfismo genotipico comune A/A di IL-15R α .

Abbreviazioni: Class 1, donne pre-obese-obese; Class 2, donne NWO; EXO4, esone 4, variante C / A; INTRO5, esone 5 introne-esone–exon border, variant A / G; EXO7, esone 7, variante A / C.

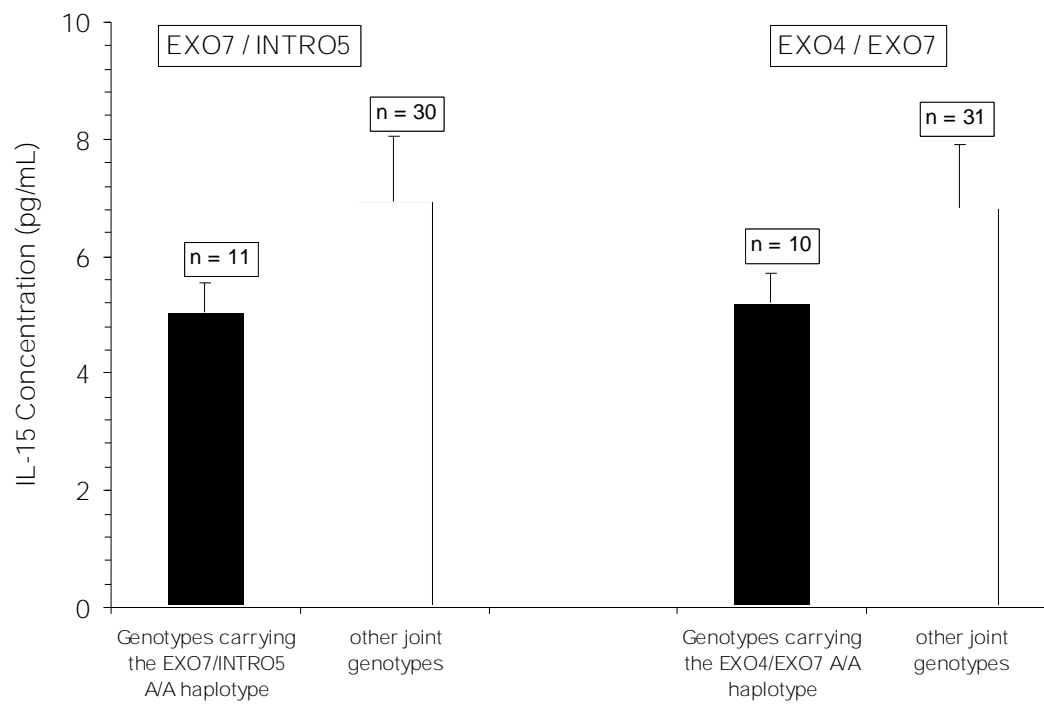


Figura 10. Concentrazioni di IL-15 in relazione al polimorfismo comune A/A di IL-15. I valori sono espressi come media + Errore Standard.

BIBLIOGRAFIA

Andreozzi F, Laratta E, Cardellini M, Marini MA, Lauro R, Hribal ML, et al. Plasma Interleukin-6 levels are independently associated with insulin secretion in a cohort of Italian-Caucasian nondiabetic subjects. *Diabetes* 2006; 55: 2021-4.

Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Valentine V, Shapiro DN, Morris SW, Parki LS, Cosman D. Functional Characterization of the Human Interleukin-15 Receptor α Chain and Close Linkage of IL-15RA and IL-2RA Genes. *J of Biological Chemistry* 1995; 270: 29862-69.

Argiles JM, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity. *Medicinal Research Reviews* 2005; 25: 49-65.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*, 2005, 6:221-34.

Berthier MT, Paradis AM, Tchernof A, Bergeron D, Prud'home D, Despres JP, et al. The interleukin 6 -174 G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men. *J Hum Genet* 2003; 48: 14-9.

Bittar MN, Carey JA, Barnard J, Fildes JE, Pravica V, Yonan N, et al. Interleukin 6 G-174C polymorphism influences outcome following coronary revascularization surgery. *Heart Surg Forum* 2005; 8: E140-5.

Bjorntorp P. Endocrine abnormalities in obesity. *Diabetes Reviews* 1997, 5:52-68.

Bjorntorp P. Abdominal obesity and the development of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1988; 4: 615-622.

Bjorntorp P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Ann Med* 1992;24: 645-468.

Bonora E. et al.: Homeostatic Model Assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care*. Jan 2000.

Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Alvarez B, Busquets S, Baccino FM, Quinn LS, López-Soriano FJ, Argilés JM. Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of

adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochimica et Biophys Acta* 2001; 1526:17-24

Cardellini M, Perego L, D'Adamo M, Marini MA, Procopio C, Hribal ML, et al. G. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. *Diabetes Care* 2005; 28: 2007-12.

Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque r, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleuchin-6. *Hepatology* 1990;12:1179-1186.

Chen H. Cellular inflammatory responses: Novel insights for obesity and insulin resistance. *Pharmacological Research* 2006;53:469-477.

Consensus Development Conference on Insulin Resistance. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 21, 310-314, 1998.

Conus F, Allison DB, Rabasa- Lhoret R, St-Onge M, St-Pierre DH, Tremblay- Lebeau A, Poehlman. ET. Metabolic and Behavioral Characteristics of Metabolically Obese but Normal- Weight Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5013-5020.

Coppak SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. Proc Nutr Soc 2001;60:349-56.

De Lorenzo A. et al. Body impedance measurements during dialysis. Renal Physiology 1991;17: 326-332.

De Lorenzo A. et al. Multifrequency impedance in the assessment of body water losses durin dialysis. Renal Physiology 1994; 17: 326-332.

De Lorenzo A. et al. Determination of intra-cellular water by multifrequency bioelectrical impedance. Ann Nutr Metab 1995;39: 177-184.

De Lorenzo A. et al. Predicting body cell mass with bioimpedance by using theoretical methods: a technological review. J Appl Phisiol 1997 May; 82(5): 1542-58.

De Lorenzo A. et al. Within subject variability in body composition using dual energy x-ray absorptiometry. Clin Physiol 1997; 17(4): 383-388.

De Lorenzo A. et al. Total body capacitance correlates with total body potassium. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000; vol 904: 259-263.

De Lorenzo A, Andreoli A, Bertoli S, Testolin G, Oriani G, Deurenberg P. Resting metabolic rate in Italians: relation with body composition and anthropometric parameters. *Acta Diabetol* 2000; 37: 77-81.

De Lorenzo A, Tagliabue A, Andreoli A, Testolin G, Comelli M, Deurenberg P. Measured and predicted resting metabolic rate in Italian males and females, aged 18-59 y. *Eur J Clin Nutr* 2001; 54:208-214.

De Lorenzo A. et al. Composizione corporea e metodi di misura. Mary E, Barasi: *Nutrizione e salute*, EMSI 2003, Cap. 18: 373-402.

De Lorenzo A, Deurenberg P, Pietrantuono M, Di Daniele N, Cervelli V, Andreoli A. How fat is obese?. *Acta Diabetol* 2003; 40: S254-S257.

De Lorenzo A, Martinoli R, Vaia F, Di Renzo L. Normal weight obese (NWO) women: an evaluation of a candidate new syndrome. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2006;16:513–23.

De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni, Galvano F, and Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2007; 85: 40 –5.

Di Renzo L, Bigioni M, Bottini FG, Del Gobbo V, Premrov MG, Cianci R, De Lorenzo A. Normal Weight Obese Syndrome: role of single nucleotide polymorphism of IL-15R α and MTHFR 677 T genes in the relationship between body composition and resting metabolic rate. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2006; 10(5):235-245.

Di Renzo L, Del Gobbo V, Bigioni M, Premrov MG, Cianci R, De Lorenzo A. Body composition analyses in normal weight obese women. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2006;10(4):191-196.

Di Renzo L, Bigioni M, Del Gobbo V, Premrov MG, Barbini U, Di Lorenzo N, De Lorenzo A. Interleukin-1 (IL-1) Receptor Antagonist Gene Polymorphism in Normal Weight Obese syndrome: Relationship to body composition and IL-1 α and β plasma levels. *Pharmacological Research*, 2007, 55: 131–138.

Di Renzo L, Bertoli A, Bigioni M, Del Gobbo V, Premrov MG, Calabrese V, Di Daniele N, De Lorenzo A. Body Composition and -174G/C Interleukin-6 Promoter Gene Polymorphism: Association with Progression of Insulin Resistance in Normal Weight Obese Syndrome. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14, 2699-2706.

Di Renzo L, Gloria-Bottini F, Saccucci P, Bigioni M, Abenavoli L, Gasbarrini G, De Lorenzo A. Role of Interleukine 15 receptor polymorphisms in Normal Weight Obese syndrome. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *in press*.

Dinareello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095–147.

Doll S, Paccaud F, Bovet P, Burnier M, Wietlisbach V. Body mass index, abdominal adiposity and blood pressure: consistency of their association across developing and developed countries. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:48 –57.

Dubois S, Magrangeas F, Lehours P, Raheer S, Bernard J, Boisteau O, Leroy S, Minvielle S, Godard A, Jacques Y. Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 26978-84.

Dvorak RV, De Nino F, Ades AP, Poehkman ET, Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal weight young women. *Diabetes* 1999; 48: 2210-2214.

Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, Mohlig M, Pfeiffer AFH, Luft FC, Sharma AM. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003;52:942-947.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the third Report of the National Cholesterol Education

Program (NCPE) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) JAMA 2001; 285: 2486-2497.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. J Allergy Clin Immunol 2005;115:911-919.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH, Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: finding from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA 2002; 287: 356-359.

Grundy SMG, Brewer B, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome. Circulation 2004;109:433– 8.

Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. Proc Nutr Soc 2005;64:163-169.

Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, Shimizu Y, Sakaguchi M, Nagai Y, Iyama S, Yamanishi H, matsumoto M, Hori M. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. Circulation 2001;104:63-67.

Hitman GA, Sudagani. Searching for genes in diabetes and the metabolic syndrome. J Int J Clin, 2004, 143:3-8.

Hoffstedt J, Wahrenberg H, Thorne A, Lonnqvist F. The metabolic syndrome is related to beta 3-adrenoreceptor sensitivity in visceral adipose tissue. *Diabetologia* 1996;39: 838-844.

Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukine-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001; 22: 2243-52.

Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, Wolford JK, et al. IL-6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes* 2006; 55: 2915-21.

IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *IDF / Promoting Diabetes Care, prevention and a cure worldwide*, April 2005.

Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97: 14-32.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1154-9.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. 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* 1998; 102: 1369-76.

Freeman BD, Buchman TG. Interleukin-1 receptor antagonist as therapy for inflammatory disorders. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:301–308.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 149: 1-38.

Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza Ec, Murashima S, Maruyama N, Morioka K, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in Japanese metabolically preobese/obese, normal weight subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2003; 26: 2341-2344.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:745-51.

Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, Rabasa-Lhoret R, Poehlman ET. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2569–2575.

Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, et al. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4145–50.

Kubaszek A, Pihlajamaki J, Punnonen K, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso. The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. *Diabetes* 2003; 52: 558-61.

Lara–Castro C, Weinsier RL, Hunter GR, Desmond R., Visceral adipose tissue in women: longitudinal study of the effects of fat gain, time, and race. *Obesity Research* 2002; 10 (9): 868-874.

Lennard A, Gorman O, Carrier M, Griffiths S, Scotney H, Sheer D, et al. Cloning and chromosome mapping of human interleukin-1 receptor antagonist gene. *Cytokine* 1992;4:83–9.

Lohman TG, Roche AF, Martorell R Anthropometric standardization reference manual: Human Kinetics, Champaign, IL, 1998, 121-133.

Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: Adiposity, Inflammation and Atherogenesis. *Endocrinology* 2003;144:2195-2200.

LH Tseng, PJ Chen, MT Lin et al. Single nucleotide polymorphisms in intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1 beta and IL-1Ra polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese. *Tissue Antigens*, 2001. 57:318–324.

Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo et al Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 2001. 121:823-9.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.

Mitelman, F. *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. 5th ed. Wiley-Liss, New York, 1994; p. 1656-1787.

Mohlig M, Boeing H, Spranger J, Osterhoff M, Kroke A, Fisher E, et al. Body mass index and C-174G interleukin-6 promoter polymorphism interact in predicting type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89: 1885-90.

Palli D, Saieva C, Luzzi I, Masala G, Topa S, Sera F, et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *Am J Gastroenterol* 2005;9:941–1948.

Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Research and Clinical Practise* 2005; 69: 29-35.

Parodi E, De Lorenzo A. Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases, Geneva, WHO Technical Report Series 2003;916:1–149.

Quinn LS, Anderson BG, Drivdahl RH, Alvarez B, Argilés JM. Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: Implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp Cell Res* 2002; 280: 55-63

Rexrode MK, Carey JV, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willet WC, Manson JE, Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998; 280: 1843-1848.

Riechman ER, Balasekaran G, Roth SM, Ferrell RE. Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. *J Appl Physiol* 2004; 97: 2214-19.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-843.

Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001;285:2481-2485.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-1565.

Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P, The metabolically-obese, normal weight individual. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 1617-1621.

Ruderman NB, Berchtold P, Schneider S, Obesity associated disorder in normal weight individual: some speculation. *Int J Obesity* 1982; 6: 151-157.

Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunier X, Schneider S. The metabolically obese normal weight revisited. *Diabetes* 1998;47:699 –713.

ST-Onge MP, Janssen I, Heymsfield SB. Metabolic Syndrome in Normal-Weight Americans. *Diabetes Care* 2004; 27(9): 2222-2228

Roux-Lombard P. The interleukin-1 family. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9:565–576.

Santtila S, Savinainen K, Hurme M Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 1998, 47:195-8.

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF- α by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* , 1996, 57, 1111-1116.

Schork NJ, Cardon LR, Xu X. The future of genetic epidemiology. *Trends Genet* 1998; 14:266-72.

Seripa D, Dobrina A, Margaglione M, Matera MG, Gravina C, Vecile E. Relevance of interleukin-1 receptor antagonist intron-2 polymorphism in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2003;15:276–81.

Spranger J, Kroke A, Mohling M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003; 52: 812-7.

Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr*, 2004,134: 2090S-2105.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116 :1793-801.

Smith SR, Ravussin E. Genetic and physiological factors in obesity. *J La State Med Soc*, 2005, 157:12-18.

Stephens JW, Hurel SJ, Cooper JA, Acharya J, Miller GJ, Humphries SE. A common functional variant in the interleukin-6 gene is associated with increased body mass index in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Mol Genet Metab* 2004; 82: 180-6.

Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91:403–4.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275: 18138-44.

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

Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions* 2005;33:1078-1081.

Trayhurn P, Bing C, Wood S. Adipose tissue and Adipokines-Energy Regulation from the human perspective. *American Society for Nutrition, The WALTHAM International Nutr sciences symposia* 2006;1935-1939.

Tseng LH, Chen PJ, Lin MT, et al. Single nucleotide polymorphisms in intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1 beta and IL-1Ra polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese. *Tissue Antigens* 2001;57:318–24.

Um JY, Lee KM, Kim HM. Polymorphism of interleukin-1 receptor antagonist gene and obesity. *Clin Chim Acta* 2004;340:173–7.

Van Der Meer IM, De Maat MP, Hak AE, Kiliaan AJ, Del Sol AI, Van Der Kuip DA, Nijhuis RL, Hofman A, Witteman JC. C-reactive protein predicts progression of atherosclerosis measured at various sites in the arterial tree: the Rotterdam Study. *Stroke* 2002;33:2750-2755.

Voarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart R, Hanson RL, Gruber JD, et al. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112: 409-13.

You T, Ryan AS, Nicklas J, The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. *The Journal of Clin Endocrinology & metabolism* 2004; 89 (11): 5517-5522.

Yang X, Jansson PA, Pellmè F, Laasko M, Smith U. Effect of Interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism on adiponectine and insulin sensitivity. *Obes Res* 2005; 13: 813-7.

Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM. Adiponectin, Inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *The Journal of Clin Endocrinology & metabolism* 2004; 89(6):2697-2703.

Wernstedt I, Eriksson AL, Berndtsson A, Hoffstedt J, Skrtik S, Hedner T, et al. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *Int Journal Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 1272-9.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003;112:1796-1808.

WHO PHYSICAL STATUS. The use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series 854. 1995; WHO, Geneva, Switzerland.

WHO 1998 OBESITY. Preventing and managing the global epidemic. Report on a WHO Consultation of Obesity. Geneva, 3-5 June, WHO/NUT/NCD/98.1 1998; Geneva, Switzerland.

.RINGRAZIAMENTI