

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

SCIENZE DELL'ALIMENTAZIONE E DELLA

NUTRIZIONE -XXI CICLO

COORDINATORE: Prof. CLAUDIO FALCONI

TESI DI DOTTORATO

**NUOVE MUTAZIONI NEI GENI DELLA PRO-
OPIOMELANOCORTINA E DEL RECETTORE 4
DELLA MELANOCORTINA IN ADULTI GRAVI
OBESI**

Tutore

Dottoranda

Ch.mo Prof.

Dr.ssa

Franco Contaldo

Lidia Santarpia

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

INDICE

Cap. 1 - Introduzione	pag. 3
1.1 -Definizione ed epidemiologia dell'obesità	pag. 3
1.2 - La sindrome metabolica	pag. 4
1.3 -Circuito della melanocortina	pag. 4
Cap. 2 – Scopo dello Studio	pag. 7
Cap. 3 - Soggetti e metodi	pag. 8
3.1 – Pazienti	pag. 8
3.1.1 - Parametri antropometrici, biochimici e clinici	pag. 8
3.1. 2 - Profilo psicopatologico	pag. 9
3.2 – Controlli	pag. 10
3.3 - Amplificazione del DNA genomico e sequenziamento	pag.11
3.4 - Analisi mediante HPLC	pag. 12
3.5 - Protein Truncation Test	pag. 12
3.6 - Studio di predizione della struttura proteica	pag. 13
Cap. 4 – Analisi statistica	pag. 15
Cap. 5 – Risultati	pag. 16
Cap. 6 – Discussione	pag. 21
Cap. 7 - Bibliografia	pag.25

INTRODUZIONE

1.1 - Definizione ed epidemiologia dell'obesità

L'obesità è una patologia cronica a genesi multifattoriale, causata dall'interazione variabile di componenti genetiche ed ambientali (stile di vita sedentario, aumentato consumo di grassi e di zuccheri semplici) che comporta una disregolazione nel bilancio energetico, promuovendo un aumento dei depositi di grasso (1-6)

La componente genetica sembra incidere per il 30-40% e quella ambientale/comportamentale per il rimanente 60-70% (7-8). Nei figli di genitori obesi viene riportata un'incidenza di obesità del 40% se un solo genitore è obeso e maggiore del 70% se lo sono entrambi (9-11).

L'obesità aumenta il rischio di morbidità e mortalità per l'insorgenza di complicanze metaboliche, cardiovascolari, respiratorie e osteoarticolari e neoplastiche (2,7,11,12).

In relazione all'Indice di Massa Corporea ($IMC = \text{peso}/\text{altezza}^2 = \text{kg}/\text{m}^2$) l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) distingue l'obesità di I ($30 < IMC < 34.9$), II ($35 < IMC < 39.9$) e III (> 40) grado.

L'obesità rappresenta il più comune disordine nutrizionale nel mondo occidentale e la sua prevalenza è in progressivo aumento anche nei paesi in via di sviluppo. L'incremento è indubbiamente legato al benessere e alla disponibilità di cibo nel mondo occidentale oltre che a fattori socioculturali. Recenti stime indicano una prevalenza di obesità nel 15% della popolazione adulta europea. Secondo una recente indagine ISTAT, in Italia il 33,4% degli adulti di entrambi i sessi è in sovrappeso e il 9,1% è francamente obeso ($IMC \geq 30 \text{ Kg}/\text{m}^2$); in 1/5 casi, l'obesità è di alto grado. Il 30-35% dei bambini italiani è in sovrappeso ed il 10-12% obeso, con un'elevata frequenza tra i 9 ed i 13 anni. Negli Stati Uniti circa la metà della popolazione è in netto sovrappeso e circa il 22.5% è obesa. (13-15).

1.2 - La Sindrome Metabolica

La sindrome metabolica, fortemente associata ad insulino-resistenza e adiposità viscerale, è un insieme di fattori di rischio metabolici che promuovono direttamente lo sviluppo della patologia aterosclerotica cardiovascolare (12). Il tessuto adiposo, infatti, è una riserva di molecole bioattive che agiscono localmente, come le citochine, o a distanza, con azione endocrina (Figura 1). Queste proteine, o adipocitochine, che comprendono, tra l'altro TNF α , IL 6, leptina, adiponectina e resistina, intervengono nella regolazione di numerose funzioni, come l'appetito e del bilancio energetico, il sistema immunitario, la sensibilità all'insulina, l'angiogenesi, la pressione arteriosa, il metabolismo lipidico e l'emostasi, tutte correlate alla patologia cardiovascolare (16-17). Secondo la AHA/NHLBI (12) si definisce Sindrome Metabolica la presenza di 3 o più dei seguenti fattori:

- **glicemia a digiuno** \geq 100 mg/dL (5.55 mmol/L);
- **trigliceridemia** \geq 150 mg/dL (\geq 1,70 mmol/L);
- **HDL-colesterolo plasmatico** \leq 40 mg/dL ($<$ 1,04 mmol/L) nell'uomo e \leq 50 mg/dL ($<$ 1,29 mmol /L) nella donna;
- **pressione arteriosa sistolica** \geq 130 mm/Hg e **diastolica** \geq 85 mm/Hg;
- **circonferenza vita** \geq 102 cm per gli uomini e \geq 88 cm per le donne

1.3 - Circuito della melanocortina

La regolazione del peso corporeo è un meccanismo finemente regolato da vie nervose, ormonali e metaboliche. Se l'introito calorico supera la spesa energetica, l'eccesso di energia viene immagazzinato come riserva di grasso negli adipociti. Nel tessuto adiposo esistono "sensori" in grado di indicare l'entità dei depositi di grasso e trasmettere informazioni a recettori presenti a livello ipotalamico (18-19). Numerosi neurotrasmettitori e neuropeptidi

interagiscono tra loro creando una rete complessa di segnali che regolano l'equilibrio energetico.

La leptina è un peptide similcitosinico prodotto dal tessuto adiposo in concentrazioni direttamente proporzionali al contenuto di grasso corporeo. Essa oltrepassa la barriera emato-encefalica legandosi al suo recettore ipotalamico (ObRb), situato in due differenti sottopopolazioni di neuroni del nucleo arcuato e attivando segnali che riducono il senso di fame ed aumentano il dispendio energetico. Una popolazione di neuroni esprime 2 neuropeptidi oressizzanti: Neuropeptide Y (NPY) ed Agouti Related Protein (AgRP), la cui espressione è inibita dalla leptina; altri neuroni esprimono 2 neuropeptidi anoressizzanti: Cocaine and Amphetamine Related Transcript (CART) e POMC (proopiomelanocortina) la cui espressione è indotta dalla leptina (Figura 2) (20-25).

La proopiomelanocortina umana (POMC) è una proteina di 267 aminoacidi sintetizzata principalmente nell'ipofisi, nel nucleo arcuato dell'ipotalamo, nel tratto solitario della medulla, nella pelle, nel sistema immunitario. Essa è precursore di numerosi altri peptidi biologicamente attivi derivati da un processing post-traduzionale operato da specifici enzimi, le proconvertasi 1 e 2 (PC1 e PC2): α -, β - e γ -MSH, ormone adrenocorticotropo (ACTH), le lipoproteine e β -endorfina che hanno attività biologiche differenti a secondo del recettore della melanocortina al quale si legano (Figura 3).

L'attività dei peptidi derivati da POMC viene mediata da una famiglia di proteine- recettore leganti la guanosina trifosfato, uno dei quali è il recettore della melanocortina 4 (MC4R) che viene prodotto in elevate concentrazioni nel sistema nervoso centrale e riveste un ruolo importante nel controllo dell'introito calorico e del bilancio energetico (26-30).

La prima diretta evidenza che il gene POMC e i suoi peptidi siano coinvolti nel controllo dell'appetito deriva da uno studio in cui sono stati descritti due bambini affetti da iperfagia e obesità causate da difetti nel gene POMC. Il

primo bambino aveva un difetto nella sintesi di ACTH e α -MSH, il secondo presentava un'alterazione della traduzione del gene POMC.

La scoperta di altre mutazioni del gene POMC ha confermato il legame tra questo gene e l'obesità nell'uomo e nell'animale da esperimento (18,20,26).

Iperfagia, obesità ed iperinsulinemia sono caratteristiche dei ratti knock-out per MC4R; varie mutazioni missenso e nonsenso di MC4R sono state riportate in pazienti con obesità grave ad insorgenza precoce (21, 31-34).

Inoltre, la correlazione tra l'alterazione di questo recettore e l'iperfagia così come l'associazione con un comportamento alimentare di tipo "binge" sottolinea l'importanza di MC4R nel controllo del comportamento alimentare nell'uomo (35-38). Sembra, inoltre, che le varianti genetiche del recettore MC4R influenzino anche lo sviluppo di patologie associate all'obesità come la sindrome metabolica e la risposta al trattamento chirurgico nell'obesità di alto grado (39).

Cap. 2 – SCOPO DELLO STUDIO

In 196 pazienti gravi obesi, residenti nell'Italia Meridionale obiettivi dello studio sono:

- definizione delle caratteristiche cliniche, antropometriche e biochimiche.
- caratterizzazione genetica per i geni che codificano per la proopiomelanocortina (POMC) e per il recettore dell' α MSH (MC4R)
- confronto con una popolazione di 100 soggetti normopeso (BMI<25), al fine di individuare mutazioni e/o polimorfismi che potrebbero essere coinvolti nell'insorgenza dell'obesità
- esaminare la relazione tra fenotipo clinico e genetico-molecolare.

Cap. 3 – SOGGETTI E METODI

3.1 - Pazienti

Sono stati studiati 196 pazienti [111 F (56,6%) e 85 M (43,4%)] di età compresa tra i 18 ed i 70 anni, reclutati nell'Ambulatorio per la terapia dell'Obesità di alto grado del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università Federico II di Napoli.

I criteri di esclusione dallo studio sono stati: età inferiore a 18 e superiore a 70 anni, $IMC < 40 \text{ Kg/m}^2$, presenza di diabete e/o patologia coronarica.

3.1.1 - Parametri antropometrici, biochimici e clinici.

Per ogni paziente sono stati misurati il peso corporeo, l'altezza e calcolato l'indice di massa corporea ($IMC = \text{Kg/m}^2$). La circonferenza vita è stata misurata in cm con un metro flessibile, su un piano orizzontale passante sulle creste iliache, alla fine di una normale espirazione. La circonferenza dei fianchi è stata misurata nel punto più largo sotto le creste iliache, all'altezza del grande trocantere. E' stato, quindi, calcolato il rapporto vita/fianchi.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti agli esami ematochimici di routine, che includono: glicemia, colesterolo totale, HDL colesterolo, trigliceridi, AST, ALT, e ad esami ormonali: TSH, FT3, FT4, ACTH, cortisolo ed insulina; sono stati determinati, inoltre, anche i valori di leptinemia.

Un campione di sangue intero è stato infine raccolto per l'analisi genetica e di biologia molecolare.

La pressione arteriosa è stata misurata al braccio destro del paziente dopo cinque minuti in posizione seduta, con uno sfigmomanometro standard ed un bracciale di taglia grande; la frequenza cardiaca è stata valutata al polso radiale.

I criteri utilizzati per la diagnosi di sindrome metabolica sono quelli definiti dalla AHA/NHLBI (12): circonferenza vita $\geq 102 \text{ cm}$ per gli uomini e $\geq 88 \text{ cm}$ per le donne, trigliceridemia $\geq 150 \text{ mg/dl}$, pressione arteriosa $\geq 130/85$

mmHg, HDL \leq 40 mg/dl negli uomini e \leq 50mg/dl nelle donne e glicemia \geq 100mg/dl. Si definisce sindrome metabolica la presenza di 3 o più dei suddetti fattori (12).

E' stato inoltre calcolato l'HOMA come indice di insulino-resistenza sulla base della glicemia a digiuno e dei livelli di insulinemia secondo la seguente formula:

glicemia a digiuno (mmol/L) x insulina (μ U/L) / 22,5 (13).

E' stata inoltre valutata la composizione corporea (% massa magra e massa grassa) con bioimpedenziometria (STA/BIA Akern, Milano Italia).

3.1.2 – Profilo psicopatologico

In un sottogruppo di 63 (25 M; 38 F) pazienti affetti da obesità di alto grado è stata effettuata anche una valutazione del comportamento alimentare nel corso di una consulenza psichiatrica; sono state così ottenute le seguenti tipologie di comportamento alimentare:

Sweet-eater: preferenza per i cibi dolci

Gorging: mangiatore di grandi quantità di alimenti

Snacker: assume piccoli spuntini a intervalli regolari

Binge eating disorder (BED): assunzione incontrollata di grandi quantità di alimenti

Nibbling: assume continuamente piccole quantità di cibi per volta

I comportamenti alimentari ottenuti sono stati raggruppati in due categorie:

1. snacker, gorging, sweet eater
2. BED, nibbling

per distinguere i pazienti con un profilo psicopatologico più compromesso (gruppo 1).

Un'ulteriore classificazione in gruppi è stata effettuata per distinguere i comportamenti alimentari caratterizzati dall' ingestione di grandi quantità di

cibo in breve tempo (BED e gorging) da quelli caratterizzati dall' ingestione di cibo più dilazionata nel tempo (snacker, sweet eater, nibbling).

3.2 - Controlli

Il gruppo di controllo è costituito da 100 soggetti sani e normopeso (IMC < 25 Kg/m²), 34 M e 66 F, di età compresa tra i 26 ed i 76 anni, che sono stati sottoposti all' analisi genetica ed alla misurazione dei valori di leptinemia, questi ultimi utilizzati come valori di riferimento.

Dal sangue intero dei soggetti obesi e dei controlli è stato estratto il DNA per il sequenziamento dei geni che codificano per POMC ed MC4R. E' stata effettuata anche una previsione della struttura secondaria dei peptidi β -MSH ed MC4R derivati dai geni mutati.

Tutti i partecipanti hanno espresso il consenso informato per l' inserimento nello studio. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico Locale, in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

3.3 - Amplificazione del DNA genomico e sequenziamento

Il DNA genomico dei soggetti obesi e dei controlli è stato estratto da sangue intero (Nucleon BACC-2, Amersham Biosciences Europe, Milano, Italia).

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

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

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

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

Tabella 1. Primers e condizioni di PCR

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

3.4 - Analisi mediante HPLC

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

3.5 - Protein Truncation Test

Per verificare la presenza della mutazione E244X nell'esone 3 di POMC abbiamo utilizzato il protein truncation test che prevede l'aggiunta di 5 µl del prodotto di PCR e 1 µl di [³H] Leu ad un lisato di reticolociti (Promega, Madison, USA). Il primer upstream contiene segnali eucariotici per una

trascrizione ed una traduzione efficiente (il promotore T7 e il sito di inizio di trascrizione). Gli oligonucleotidi usati per l'amplificazione del frammento B sono: 5'-T7-GAGTGCATCCGGGCCTGCAAG-3' e 3'UTR: 5'-CGATCCATGCTGCTGTTATTT -3'. Condizioni per la PCR: 1 ciclo a 94 °C (5 min), 35 cicli a 94 °C (30 sec), 60 °C (30 sec), 72 °C (45 sec) e 10 min di allungamento finale a 72 °C.

Il peso molecolare dei prodotti di PCR (wild type e mutato) è stato verificato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 5%. Un'aliquota di 9 µl dei prodotti di reazione è stata denaturata con 3 µl di loading buffer e caricata su un gel SDS di poliacrilammide al 15%.

I pesi molecolari dei due frammenti sono stati assegnati confrontandoli con uno standard SDS-PAGE (range 6.9–205 kDa) (Kaleidoscope Prestained Standard, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) analizzato nelle stesse condizioni sperimentali. Infine, il gel è stato fissato, seccato e autoradiografato.

3.6 - Studio di predizione della struttura proteica

E' stato praticato uno studio di predizione della struttura secondaria del peptide mutato β -MSH usando il programma GOR 4, e utilizzando PSI-BLAST multiple sequence (40) per l'allineamento della sequenza proteica β -MSH.

3.7 - Analisi biochimiche

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

Le concentrazioni di colesterolo totale e di trigliceridi sono stati misurati con i classici metodi enzimatici (41-42). Le HDL sono state misurate dopo precipitazione delle LDL e le LDL sono state calcolate con la formula di Friedewald.

I livelli di TSH, FT3 e FT4 sono stati misurati con dosaggio immunoenzimatico (Abbot Laboratories, Rome, Italy); i livelli di insulina sierica, cortisolo e ACTH dosati mediante chemiluminiscenza (Immilight 2000, Medical System, Genova, Italy).

I livelli di glucosio sono stati misurati con il metodo dell'esochinasi.

L'attività transaminasica è stata determinata con il metodo IFCC.

Cap. 4 – ANALISI STATISTICA

Le analisi statistiche sono state eseguite con il pacchetto SPSS per Windows, versione 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

I risultati sono stati espressi come media \pm DS per le variabili continue.

Il confronto tra le medie di due gruppi è stato effettuato con il t-test di student per campioni non appaiati.

Il test del Chi quadrato (χ^2) è stato utilizzato per il confronto tra i gruppi per le variabili categoriche.

Le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative con $p < 0.05$.

Cap. 5 - RISULTATI

Le caratteristiche antropometriche, gli indici biochimici e le concentrazioni sieriche degli ormoni dei 196 pazienti obesi reclutati sono riportate nelle tabelle 2 e 3.

Tutti i pazienti obesi presentano una circonferenza vita superiore ai cut-off. In tutti i pazienti obesi, i valori sierici di TSH, FT3, FT4, ACTH e cortisolo sono risultati nei limiti della norma.

I maschi hanno un rapporto vita- fianchi significativamente più alto rispetto alle donne, così come la % di massa magra e di massa grassa misurata con la bioimpedenziometria. Anche la pressione arteriosa, sia sistolica che diastolica, le transaminasi, l' insulina e l' HOMA sono significativamente più elevati nei maschi che nelle femmine.

Il colesterolo HDL ed i valori di leptinemia, invece, sono significativamente più elevati nelle donne. Gli intervalli di riferimento ottenuti nei nostri controlli sono 1.1 -19.7 µg/L nei maschi e 2.3 -56.1 µg/L nelle donne. In particolare, nei maschi e nelle femmine, i valori di leptinemia sono rispettivamente 3,4 e 2,5 volte più alti dei valori di riferimento ottenuti dal gruppo di soggetti sani distinti per sesso. La leptina risulta significativamente e positivamente correlata all'IMC in entrambi i sessi (M: $p < 0.0001$, F: $p = 0.002$). mentre non esistono differenze significative nei pazienti con e senza sindrome metabolica.

La prevalenza di sindrome metabolica, definita secondo i criteri AHA/NHLBI (4), risulta uguale nei due sessi: 70,6% negli uomini e 73,5% nelle donne.

Come dettagliato nella tabella 4, polimorfismi di POMC ed MC4R sono stati osservati nel 53,5% dei soggetti obesi e nel 53% dei controlli.

In 8 dei 196 (4%) soggetti obesi sono state individuate, invece, mutazioni di POMC e di MC4R: 3 mutazioni di POMC, di cui 2 nuove ed una già nota, e 5 mutazioni di MC4R (4 nuove ed 1 già nota). Nessuna mutazione è stata invece trovata nei controlli.

Non è stata trovata nessuna associazione tra la presenza di varianti del gene POMC e la presenza di sindrome metabolica. La tabella 5 riporta le caratteristiche fenotipiche degli 8 pazienti con mutazione dei geni POMC ed MC4R.

Nella tabella 6 sono riportate le frequenze dei vari tipi di comportamento alimentare osservati nel sottogruppo di 63 pazienti che hanno effettuato la consulenza psichiatrica. I comportamenti alimentari ottenuti sono stati raggruppati in due categorie per distinguere quelli con un profilo psicopatologico più compromesso (gruppo 1) dagli altri:

1. snacker, gorging, sweet-eater (43 pazienti)
2. binge eating disorder (BED), nibbling (20 pazienti).

Un'ulteriore classificazione in gruppi è stata effettuata per distinguere i comportamenti alimentari caratterizzati dall' ingestione di grandi quantità di cibo in breve tempo (BED e gorging: 33 pazienti) da quelli caratterizzati dall' ingestione di cibo più dilazionata nel tempo (snacker, sweet eater, nibbling: 30 pazienti).

Non è stata trovata nessuna associazione tra la presenza di varianti di POMC ed un comportamento alimentare appartenente ad uno dei due gruppi (patologico- non patologico) definiti in precedenza (tab.7).

Non è stata riscontrata, inoltre, una maggiore frequenza della sindrome metabolica nel gruppo con un comportamento alimentare caratterizzato dall' ingestione di grandi quantità di cibo in breve tempo (tab.8).

Relativamente ai 5 soggetti portatori della mutazione del gene del recettore MC4R sono noti i seguenti dettagli:

Il paziente 1 (M, 31 anni), eterozigote per la nuova mutazione W174C che determina una sostituzione aminoacidica nel quarto segmento transmembrana, ha una grave obesità (IMC: 59 Kg/m²) insorta nell' infanzia, un' anamnesi familiare positiva per obesità, diabete ed iperlipidemia, presenta i criteri per la definizione della sindrome metabolica ed ha un comportamento alimentare di tipo "snacker".

Il paziente 2 (F, 22 anni), eterozigote per un' altra nuova mutazione (Q43X), che introduce un codone di stop e produce un' interruzione della porzione N-terminale della proteina, ha anch' esso un' obesità insorta nell' infanzia, una familiarità per obesità sia nella linea materna che paterna, non presenta i criteri per la definizione della sindrome metabolica ed ha un comportamento alimentare di tipo “snacker”.

Nel paziente 3 (M, 19 anni), è stata identificata una mutazione già descritta (A157T) che è stata associata ad una parziale attività della proteina; questo paziente ha una familiarità per diabete nella linea paterna, un' obesità insorta in età infantile ed ha la sindrome metabolica; per questo paziente, non possediamo informazioni sul comportamento alimentare.

Il paziente 4 (M, 36 anni), portatore di una delezione (448delA) che determina un segnale di stop al codone 51, ha una familiarità per obesità sia nella linea materna che paterna, presenta la sindrome metabolica ed ha un comportamento alimentare di tipo “BED”.

Il paziente 5 (M, 21 anni) è eterozigote per una nuova mutazione missense (I317V) nella regione C-terminale della proteina, ha familiarità per ipertensione, una precoce insorgenza dell' obesità e non ha la sindrome metabolica. Nemmeno in questo caso abbiamo informazioni sul comportamento alimentare.

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

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

Non è stata trovata nessuna associazione tra sindrome metabolica e i polimorfismi di POMC.

Le mutazioni nel gene POMC sono state trovate in 3 dei 196 soggetti obesi studiati, due nuove e una già nota. Nessuna mutazione è stata invece trovata nei soggetti di controllo.

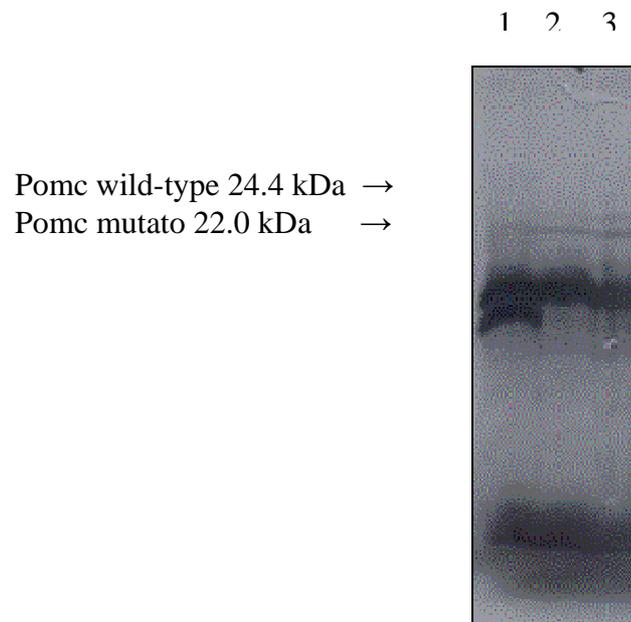
La mutazione R236G, nell'esone 3, già descritta, altera il sito di taglio K235-R236 riconosciuto dalla proconvertasi 2 (PC2), alterando il processing di POMC producendo così una proteina di fusione β -MSH/ β -endorfina, che è meno abile rispetto alla forma wild-type ad attivare il recettore MC4R (12).

La seconda mutazione (P231L), mai descritta, nell'esone 3 di POMC produce il cambio aminoacidico P231L: la sostituzione prolina-leucina modifica la sequenza del core H-F-R-W (64). β -MSH si lega al MC4R con una più alta affinità rispetto all' α -MSH, risultando il ligando principale per l'MC4R nel regolare l'assunzione di cibo (65).

La terza nuova mutazione nell'esone 3 di POMC (E244X) introduce un codone di stop a livello del peptide della β -endorfina al codone 244. Con il protein truncation test, è stato verificato che questa variante causa la sintesi di un peptide tronco (~22.0 kDa) rispetto al normale (~24.4 kDa) (Figura 3).

La mutazione pur essendo presente a livello eterozigote nel nostro paziente potrebbe comunque essere causa di obesità.

Figura 4. Analisi mediante Protein Truncation Test dei trascritti dell'esone 3 dal paziente mutato (line 1 , caso 3) e da 2 controlli non obesi (lines 2 e 3).



Cap. 6 - DISCUSSIONE

Sono stati studiati 196 pazienti affetti da obesità di alto grado, di giovane età, residenti nell' Italia Meridionale.

In questa popolazione abbiamo riscontrato un'alta prevalenza di sindrome metabolica, uguale nei due sessi, utilizzando i criteri definiti da AHA/NHLBI statement (12). Questo dato è particolarmente rilevante soprattutto se si considera l'età media dei pazienti studiati.

I valori di leptinemia, in accordo con quanto riportato in altri studi, sono risultati significativamente più alti nel gruppo di obesi rispetto ai controlli normopeso e significativamente più alti nelle donne rispetto agli uomini, questo per la maggiore quantità di tessuto adiposo presente nelle donne (43-45).

Tutti i soggetti obesi ed i controlli sono stati sottoposti all' analisi dei geni che codificano per la prooppiomelanocortina (POMC) e per il recettore ipotalamico dell' ormone melanocito-stimolante α (MC4R).

Varianti genetiche di POMC sono state osservate nel 54% dei soggetti obesi: nel 52,5% dei casi si tratta di polimorfismi, mentre nell' 1,5% dei casi (3 pazienti) si tratta di mutazioni, di cui una già descritta e due nuove. Le mutazioni sono state osservate solo nei pazienti obesi, non nei controlli.

Varianti del gene MC4R sono state, invece, osservate solo in 7 pazienti (3,5% dell' intera popolazione) di cui 5 (2,5%) sono portatori di mutazioni e 2 (1%) di polimorfismi.

In particolare, delle 5 mutazioni del gene MC4R, solo una era già nota mentre le altre 4 sono mutazioni descritte per la prima volta (46). Nessuna mutazione è stata osservata nella popolazione di controllo.

La frequenza di mutazioni dei geni POMC ed MC4R, riscontrata nella nostra popolazione di 196 pazienti con obesità di alto grado residenti nell' Italia Meridionale, è in accordo con quella descritta in altre popolazioni caucasiche di soggetti obesi: \approx 1% per la mutazione più frequente di POMC (R236G) e tra il 2% ed il 5.8% per le mutazioni di MC4R (46-52). Soltanto due studi

riportano frequenze più basse delle mutazioni di MC4R in popolazioni dell'area mediterranea: 0,5% e 1,7% rispettivamente (33,34).

Numerosi studi hanno evidenziato l'importanza del sistema che coinvolge leptina, POMC, α MSH ed i loro rispettivi recettori nel controllo del bilancio energetico, nella regolazione dell'appetito e nello sviluppo di patologie associate all'obesità.

Nel 1998, Krude e collaboratori hanno descritto per la prima volta, in due bambini, il deficit congenito della proopiomelanocortina ed hanno definito un nuovo disordine monogenico risultante in un'obesità ad insorgenza precoce, insufficienza surrenalica e colorazione rossa dei capelli (18).

Nel 2003, lo stesso gruppo, rivalutando la funzione tiroidea nei due pazienti con deficit congenito di POMC, ha osservato la presenza di un ipotiroidismo subclinico di origine ipotalamica (51), in accordo con uno studio precedente che proponeva il sistema della melanocortina come punto di unione tra i segnali periferici che riguardano il bilancio energetico e l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (52).

Per quanto riguarda MC4R, la sua importanza nella regolazione del comportamento alimentare è stata sottolineata in vari studi: nel 2003, Farooqi ha registrato un maggiore introito calorico nei pazienti con deficit di MC4R (36) e, successivamente, Branson e collaboratori hanno riscontrato che, in un gruppo di 469 pazienti con obesità di alto grado, tutti i portatori di mutazioni di MC4R avevano un comportamento alimentare di tipo "Binge Eating Disorder" (BED) (37).

Nel 2004 lo stesso gruppo ha dimostrato una maggiore prevalenza della sindrome metabolica nei portatori di mutazioni di MC4R rispetto ai non portatori (39).

Per quanto riguarda la sindrome metabolica, inoltre, la tipologia di comportamento alimentare ed, in particolare, l'"eating rate", sembrerebbero influenzarne lo sviluppo: i comportamenti alimentari caratterizzati dall'ingestione di grandi quantità di cibo in breve tempo sembrerebbero

predisporre maggiormente allo sviluppo della sindrome metabolica rispetto a quelli caratterizzati dall' ingestione di piccole quantità di cibo dilazionate nel tempo (30, 53-55).

Nel nostro studio, è stata effettuata una valutazione del comportamento alimentare in un sottogruppo di 63 soggetti obesi, sottoposti anche all' analisi genetica di POMC , ma non sono state osservate differenze statisticamente significative tra il comportamento alimentare dei portatori e quello dei non portatori di varianti del gene.

Non sono state trovate associazioni statisticamente significative neanche tra la presenza di varianti del gene POMC e la prevalenza di sindrome metabolica e tra la presenza di un particolare comportamento alimentare e la sindrome metabolica (53).

Per quanto riguarda i 5 pazienti con obesità di alto grado nei quali è stata osservata una mutazione del gene MC4R, dato il numero esiguo, è stato possibile soltanto effettuare una descrizione delle loro caratteristiche fenotipiche: si tratta di giovani con un' insorgenza precoce dell' obesità, di cui un solo paziente ha un comportamento di tipo "BED". In uno studio precedente (37), tutti i portatori di mutazioni di MC4R presentavano un comportamento alimentare di tipo "BED".

In conclusione, per quanto riguarda le caratteristiche cliniche e biochimiche della nostra popolazione di pazienti affetti da obesità di alto grado, residenti nell' Italia Meridionale, abbiamo osservato un' alta prevalenza di sindrome metabolica, uguale nei due sessi e, come atteso, livelli di leptinemia significativamente più alti rispetto ai controlli normopeso e più alti nelle donne rispetto agli uomini per la maggiore quantità di tessuto adiposo presente in queste ultime.

Dal punto di vista genetico, i polimorfismi di POMC e di MC4R osservati sono presenti con uguale frequenza nei pazienti obesi e nei controlli normopeso e non sembrano essere associati ad un particolare fenotipo.

Le mutazioni di POMC ed MC4R sono invece presenti soltanto nei pazienti obesi e non nei controlli, la loro frequenza, simile a quella descritta in altre popolazioni Caucasiche, è comunque piuttosto bassa. Non è pertanto al momento possibile trarre conclusioni sul loro ruolo nella determinazione del fenotipo clinico e del comportamento alimentare, anche se queste mutazioni hanno certamente un ruolo patogenetico in alcuni pazienti affetti da obesità di alto grado.

Cap. 7 BIBLIOGRAFIA

- 1) Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake [Review]. *Nature* 2000; 404: 661-671.
- 2) Korner J, Aronne LJ. The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 2003;111:565–70.
- 3) Marra M, Scalfi L, Contaldo F, Pasanisi F. Fasting respiratory quotient as a predictor of long-term weight changes in non-obese women. *Ann Nutr Metab* 2004;48:189–92.
- 4) Taubes G. as obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 1998;280:1367-1368.
- 5) WHO, Physical status: the use and interpretation of anthropometry, WHO technical report series 854, World Health Organization Geneva 1995.
- 6) Ranadive SA, Vaisse C. Lessons from extreme human obesity: monogenic disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008 Sep;37(3):733-51.
- 7) Egger G., Swinburn B., An “Ecological” approach to the obesity pandemic, *British Medical Journal* 1997;315:477-480.
- 8) Huang TT, Glass TA. Transforming research strategies for understanding and preventing obesity. *JAMA.* 2008 Oct 15;300(15):1811-3.
- 9) Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O’Rahilly S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics [Review]. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2557–62.
- 10) Nestle M. The ironic politics of obesity. *Science* 2003; 299:781.
- 11) Comuzzie A G, Allison D B. The search for human obesity genes. *Science* 1998; 280: 1374-1377.

- 12) S M Grundy, J I Cleeman, S R Daniels, K A Donato, R H Eckel, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/ National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752.
- 13) Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894: 1-253.
- 14) Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT): indagine sullo stato di salute e ricorso ai servizi sanitari 1999-2000, Roma.
- 15) Epidemiologia dell' obesità in Italia. Dati recenti Istituto Auxologico Italiano, quarto rapporto sull' obesità in Italia, 2002.
- 16) Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 Apr; 64 (4):355-65.
- 17) Miner JL. "The adipocyte as an endocrine cell." *J Anim Sci* 2004;82: 935-941.
- 18) Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A.
- 19) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998; 19: 155-7.
- 20) Bertolini A, Tacchi R, Vergoni AV. Brain effects of melanocortins. *Pharmacol Res.* 2008 Oct 17. Epub ahead of print.
- 21) Raffin-Sanson ML, de Keyser Y, Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions : from physiology to pathological conditions (Review). *Eur J Endocrinol* 2003;149:79-90.
- 22) Kershaw EE, Flier JS. "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endo and Metab* 2004;89 (6): 2548-2556.
- 23) Mantzoros CS, Moschos SJ. Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998 Nov; 49 (5): 551-67.

- 24) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A et al. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-295.
- 25) Chessler SD, Fujimoto WY, Shofer JB, Boyko EJ, Weigle DS. Increased plasma leptin levels are associated with fat accumulation in Japanese Americans. *Diabetes* 1998;47(2):239-243.
- 26) Chow VTK and Phoon. Measurement of serum leptin concentrations in university undergraduates by competitive elisa reveals correlations with body mass index and sex. *Advances in Physiology Education* 2003;27(2):70-77.
- 27) Echwald SM, Sorensen TIA, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O. Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 293-8.
- 28) Challis BG, Pritchard LE, Creemers JWM, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, et al. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 2002;11:1997–2004.
- 29) Farooqi IS, O'Rahilly S. Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Oct;4(10):569-77.
- 30) Irani BG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Altered hypothalamic leptin, insulin, and melanocortin binding associated with moderate-fat diet and predisposition to obesity. *Endocrinology.* 2007 Jan;148(1):310-6.
- 31) Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S,
- 32) Bertrais S, Hercberg S, Basdevant A, Clement K, Vaisse C. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype

- relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1811-8.
- 33) Miraglia del Giudice E, Cirillo G, Santoro N, D' Urso L, Carbone MT, Di Toro R, et al. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:61-7.
- 34) Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997; 88:131-41.
- 35) Miraglia del Giudice E, Cirillo G, Nigro V, Santoro N, D' Urso L, Raimondo P, et al. Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 647-51.
- 36) Santini F, Maffei M, Ceccarini G, Pelosini C, Scartabelli G, Rosellini V, et al. Genetic screening for Melanocortin-4 Receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 904-8.
- 37) Yang YK, Harmon CM. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. *Obesity Reviews* 2003; 4,239-248.
- 38) Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EG, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the Melanocortin 4 Receptor gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1085-95.
- 39) Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentes KU, Hoehe MR, Horber FF. Binge Eating as a major phenotype of Melanocortin 4 Receptor gene mutations *N Engl J Med* 2003; 348: 1096-1102.
- 40) Hebebrand J, Geller F, Dempfle A, Heinzl-Gutenbrunner, Raab M, et al. Binge eating episodes are not characteristic of carriers of

- melanocortin-4 Receptor gene mutations. *Molecular Psychiatry* 2004; 9, 796-800.
- 41) Potoczna N, Branson R, Kral JG, Picc G, Steffen R, Ricklin T, et al. Gene variants and binge eating as predictors of comorbidity and outcome of treatment in severe obesity. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 971-982.
 - 42) Yang YK, Harmon CM. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake [Review]. *Obesity* 2003;4:239-48.
 - 43) Siedel J, Schlumberger H, Klose S, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Improved reagent for enzymatic determination of serum cholesterol. *J Clin Chem Biochem* 1981;19:838-9.
 - 44) Wahlefeld AW. Triglyceride determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed., Vol. 4. Weinheim: Verlag Chemie and New York Academic Press, 1974;1831.
 - 45) Considine RV et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Eng J Med* 1996; 334, 292-295.
 - 46) Lee JH, Reed DR, Price RA. Leptin resistance is associated with extreme obesity and aggregates in families. *Int J Obes* 2001; 25, 1471-73.
 - 47) Van Dielen, Veer, Buurman, Greve. Leptin and soluble receptor levels in obese and weight losing individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1708-16.
 - 48) Buono P, Pasanisi F, Nardelli C, Ieno L, Capone S, Liguori R, Finelli C, Oriani G, Contaldo F, Sacchetti L. Six Novel Mutations in the Proopiomelanocortin and Melanocortin Receptor 4 Genes in Severely Obese Adults living in Southern Italy. *Clin Chem* 2005; 51 (8): 1358-64.
 - 49) Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, et al. Melanocortin-4 receptor gene: case-

- control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4258-67.
- 50) Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, Pedersen O. Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (1): 219-24.
- 51) Miraglia del Giudice E, Cirillo G, Santoro N, D'Urso L, Carbone MT, Di Toro R, et al. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:61-7.
- 52) Mutations in the amino-terminal region of proopiomelanocortin (POMC) in patients with early-onset obesity impair POMC sorting to the regulated secretory pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Nov;93(11):4494-9. Epub 2008 Aug 12.
- 53) Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Gruters A. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88, 4633-40.
- 54) Harris M, Asckhenasi C, Elias CF, et al. Transcriptional regulation of the thyrotropin- releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 2001; 107, 111-120.
- 55) Kral JG, Buckley MC, Kissileff HR, Schaffner F. Metabolic correlates of eating behavior in severe obesity. *Int J Obes* 2001; 25, 258-264.
- 56) Contaldo F, Pasanisi F. Obesity epidemics: secular trend or globalization consequence? Beyond the interaction between genetic and environmental factors. *Clin Nutr* 2004;23:289-9117.
- 57) Tung YC, Rimmington D, O'Rahilly S, Coll AP. Pro-opiomelanocortin modulates the thermogenic and physical activity responses to high-fat

feeding and markedly influences dietary fat preference. *Endocrinology*.
2007 Nov;148(11):5331-8. Epub 2007 Aug 23.

TABELLA 2. Caratteristiche generali ed antropometriche dei 196 pazienti obesi partecipanti allo studio^a

	Maschi	Femmine
N.	85	111
Età (anni)	32.3 (10.5)	32.4 (12.5)
IMC (Kg/m²)	48.2 (8.3)	49.3 (8.1)
Rapporto vita-fianchi	1 (0.06) ^b	0.96 (0.07)
Massa magra %^c	56.9 (5.4) ^b	48.3 (6.0)
Massa grassa %^c	43.1 (5.4) ^b	51.7 (6.8)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	134.1 (16) ^b	123.2 (16)
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	85.9 (10) ^b	79.3 (10)
Frequenza cardiaca (batt./min)	79.8 (12)	78.8 (10)

a. Tutti i valori sono espressi come media (DS).

b. $p < 0.001$.

c. misurata in 86 pazienti (39 M, 47 F)

TABELLA 3. Caratteristiche biochimiche ed ormonali dei 196 soggetti obesi partecipanti allo studio^a

	Maschi	Femmine	% di valori patologici
Colesterolo totale (mmol/l)	4.5 (0.8) ^c	4.9 (1.0)	26.5
Colesterolo HDL (mmol/l)	1.0 (0.2) ^b	1.2 (0.2)	M 50 F 59
Trigliceridi (mmol/l)	1.7 (1.1)	1.5 (0.6)	28.5
AST^d (U/l)	29.9 (13.0) ^c	24.6 (14.2)	12.2
ALT^d (U/l)	52.6 (31.5) ^b	32.1 (22.3)	37.7
Leptina^e (µg/l)	67.6 (48.1) ^b	141.5 (54.4)	
Insulina (mIU/l)	26.9 (18.5) ^c	20.3 (9.5)	43
Glucosio (mmol/l)	5.4 (1.8)	5.1 (0.8)	8
HOMA^{d-f}	6.5 (4.4) ^b	4.6 (2.4)	
TSH^d (mIU/l)	1.7 (0.8)	2.3 (2.5)	0
FT₃^d (ng/l)	2.9 (0.5)	2.9 (0.5)	0
FT₄^d(ng/l)	62 (51)	59 (53)	0
ACTH (ng/l)	39.9 (37.7)	24.4 (11.1)	0
Cortisolo^g (µg/l)	136.7 (44.8)	133.2 (59.8)	0

- a. Tutti i valori sono espressi come media (DS).
b. $p < 0.01$.
c. misurata in 86 pazienti (39 M, 47 F)
d. $p < 0.05$.
e. AST: aspartato-aminotransferasi, ALT: alanina-aminotransferasi, HOMA: homeostasis model assessment, TSH: thyroid-stimulating hormone, FT₃: free triiodothyronine; FT₄: free thyroxine.
f. Intervallo di riferimento per i controlli normopeso: 1.1-19.7 µg/l (M) e 2.3-56.1 µg/l (F).
g. HOMA: insulinemia a digiuno (mIU/L) / $[22.5 \times e^{-\ln(\text{glucosio, in mmol/l})}]$.
h. Misurato nel plasma (tutti gli altri valori sono stati misurati nel siero)

TABELLA 3a. Mutazioni e polimorfismi dei geni POMC ed MC4R in 196 pazienti con obesità di alto grado ed in 100 controlli normopeso

	Variazione aminoacidica	Variazione nucleotidica	Obesi n. (%)	Normopeso n. (%)
POMC				
Mutazioni	P231L ^a	8072C>T	1 (0.5)	0
	R236G	8086C>G	1 (0.5)	0
	E244X ^a	8110G>T	1 (0.5)	0
Totale			3 (1.5)	0
Polimorfismi	93-99	7658-7677 (ins AGC	20	6 (6)
	93-99	7658-7677 [(ins AGC	1 (0.5)	0
	3'-UTR	8246C>T	65	33 (33)
	3'-UTR	8246T>T	9 (4.6)	10 (10)
	93-99/3'-UTR	7658-7677 (ins AGC	7 (3.6)	2 (2)
	C6C/3'-UTR	4512 ^b C>T/8246C>T	1 (0.5)	0
Totale			103	51 (51)
MC4R				
Mutazioni	W174C ^a	915G>C	1 (0.5)	0
	Q43X ^a	520C>T	1 (0.5)	0
	A175T	916G>A	1 (0.5)	0
	S19fsX51 ^a	448delA	1 (0.5)	0
	I317V ^a	1342 A>G	1 (0.5)	0
Totale			5 (2.5)	0
Polimorfismi	T112M	728 C>T	1 (0.5)	0
	I103V	700 A>G	1 (0.5)	2 (2)
Totale			2 (1)	2 (2)

a. nuova mutazione

b. polimorfismo POMC esone 2

TABELLA 3b. Caratteristiche fenotipiche dei pazienti obesi con mutazioni

	IMC Kg/m²	Anamnesi familiare	Età esordio obesità	HOMA^a	Leptina µg/L	Variante POMC	Variante MC4R
Caso	52.0	Obesità (f+)	21	4.2	82.2	R236G;	WT
Caso	60.0	Obesità (f+)	18	4.3	117.0	P231L	WT
Caso	48.2	Non	20	6.8	101.2	E244X;	WT
Caso	59.0	Sovrappeso dislipidemia	8	3.9	36.1	(ins 8246T>T	W174C
Caso	45.7	Obesità (f+)	10	1.3	99.1	WT	Q43X
Caso	47.7	Diabete (m)	10	7.7	52.9	8246C>T 7677 (ins	A175T
Caso	44.0	Obesità (f+)	18	3.9	43.3	WT	S19fsX51
Caso	39.2	Ipertensione	10	1.9	47.9	8246C>T	I317V

- a. HOMA: homeostasis model assessment;
f = father; m = mother; WT = wild type.
- b. Patologie correlate: caso 1: ipertensione, colelitiasi, coxartrosi bilaterale e spondiloartrosi. Caso 2: ipertensione; caso 4: alterata tolleranza al glucosio.
- c. Questa variante (ins AGC AGC CGC) è stata ritrovata in omozigosi nel caso 3 e in eterozigoti nel caso 6.

Tabella 4. Mutazioni e polimorfismi nel gene POMC.

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

Tab. 5. Comportamento alimentare di 63 pazienti affetti da obesità di alto grado

COMPORTAMENTO ALIMENTARE	FREQUENZA	PERCENTUALE
Sweet eater	5	7,9
Gorging	24	38,1
Snacker	14	22,2
Binge	9	14,3
Nibbling	11	17,5
Totale	63	100

Tab. 6 Associazione tra comportamento alimentare e varianti genetiche di POMC nel sottogruppo di 63 pazienti obesi di cui è stato valutato il comportamento alimentare.

COMPORTAMENTO ALIMENTARE		POMC		Totale
		Wild type	Varianti genetiche	
Snacker-gorging-sweet eater	n. %	23 53.5%	20 46.5%	43
Binge-Nibbling	n. %	9 45%	11 55%	20
Totale	n. %	32 50.8%	31 49.2%	63
p		n.s.	n.s.	

Tab. 7. Associazione tra comportamento alimentare e sindrome metabolica nel sottogruppo di 63 pazienti obesi di cui è stato valutato il comportamento alimentare.

COMPORTAMENTO ALIMENTARE		SINDROME METABOLICA		Totale
		NO	Sì	
Snacker-nibbling-sweet eater	n. %	6 20%	24 80%	30
Binge- gorging	n. %	11 33,3%	22 66,7%	20
Totale	n. %	17 27%	46 73%	63
p		n.s.	n.s.	

Tab. 8. Caratteristiche fenotipiche dei 5 pazienti obesi portatori di mutazioni di MC4R

	Età (anni)	IMC (Kg/m ²)	Familiarità	Età di insorgenza dell' obesità (anni)	HOMA ^a	Leptina (µg/l)	Sindrome metabolica	Comportamento alimentare
Caso 1	31	59.0	sovrappeso(f+m)iperlipidemia e diabete (f)	8	3.9	36.1	Sì	Snacker
Caso 2	22	45.7	Obesità (f+m)	10	1.3	99.1	No	Snacker
Caso 3	19	47.7	Diabete (m)	10	7.7	52.9	Sì	-
Caso 4	36	44.0	Obesità (f+m)	18	3.9	43.3	Sì	BED
Caso 5	21	39.2	Ipertensione (m)	10	1.9	47.9	No	-

a. HOMA: homeostasis model assessment; f, father; m, mother; WT, wild type.

FIGURA 1: Secrezione di adipochine nell'adipocita

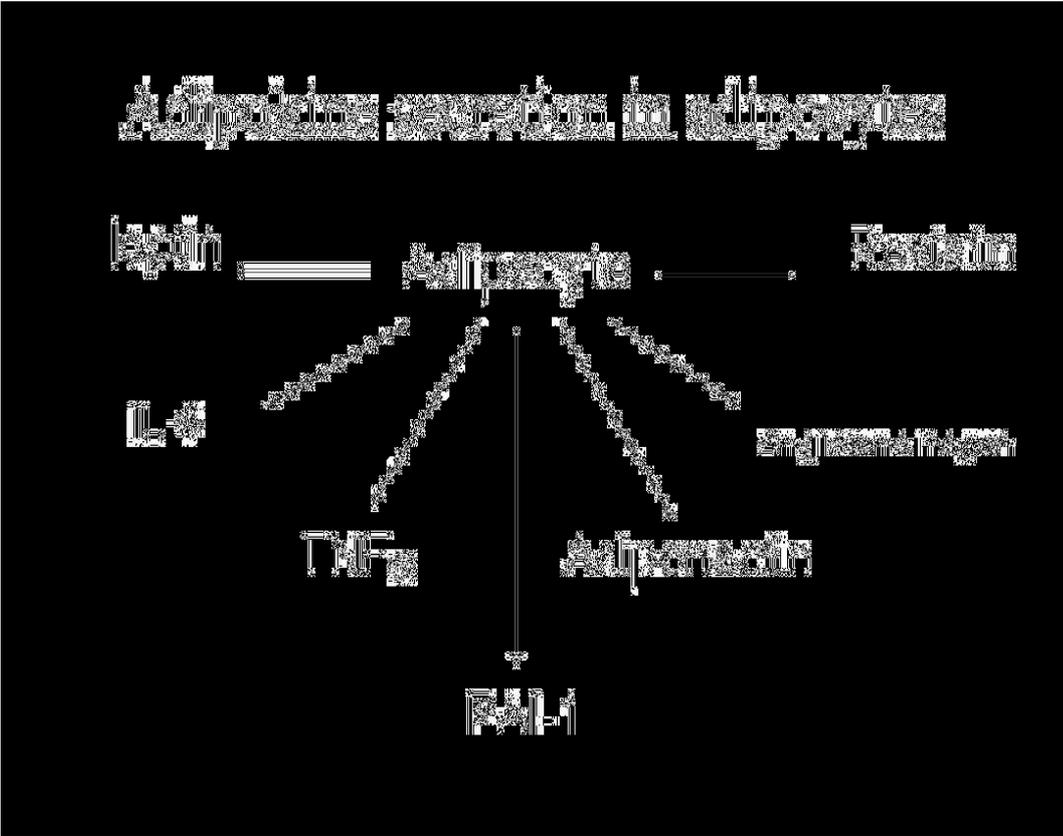


FIGURA 2: Meccanismi d'azione della melanocortina

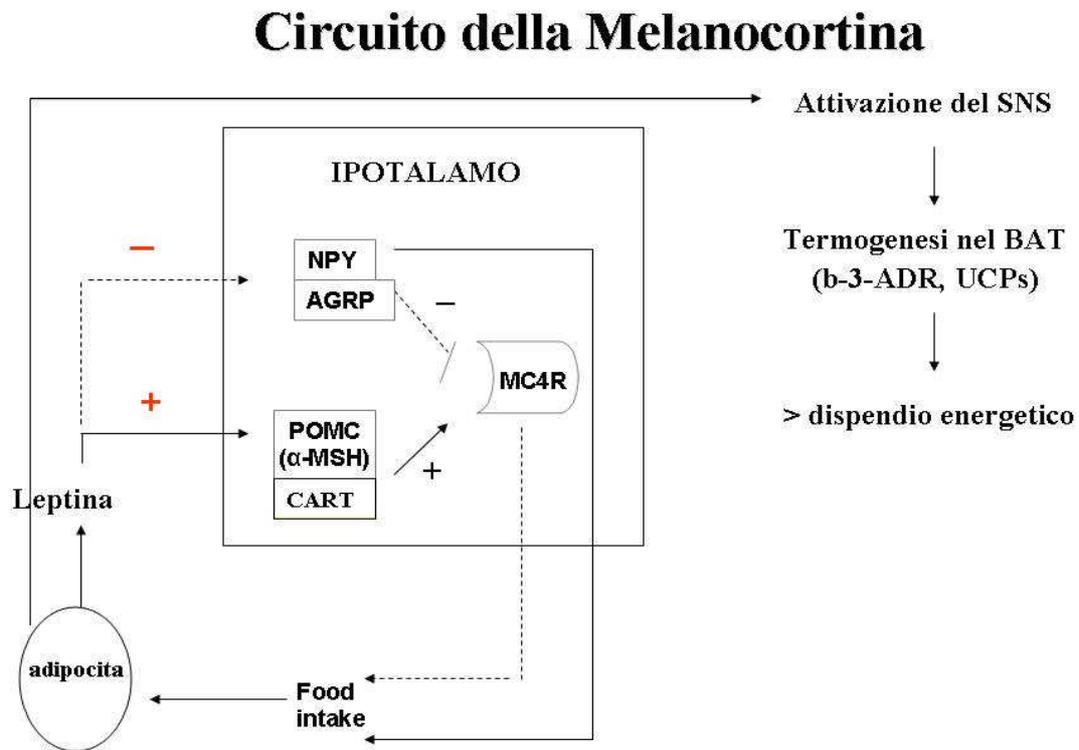


FIGURA 3: Struttura del gene POMC

