



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: METODOLOGIA CLINICA E SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE

CICLO XXI

TITOLO TESI

**EFFETTO DEI POLIMORFISMI PPAR $\gamma$  PRO12ALA E ACE I/D SUL BMI, SULLA DISTRIBUZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO E  
SUI COMPONENTI DELLA SINDROME METABOLICA (NCEP ATPIII)**

**Direttore della Scuola** : Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

**Coordinatore d'indirizzo**: Ch.mo Prof. Giovanni Federspil

**Supervisore** : Ch.mo Prof. Roberto Vettor

**Dottorando** : Edoardo Dalla Nora

## **EFFETTO DEI POLIMORFISMI PPAR $\gamma$ PRO12ALA E ACE I/D SUL BMI, SULLA DISTRIBUZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO E SUI COMPONENTI DELLA SINDROME METABOLICA (NCEP ATPIII).**

**Background:** la Sindrome metabolica è considerata il risultato dell'effetto combinato di fattori genetici ed ambientali. Geni correlati alla fisiologia del tessuto adiposo, come PPAR $\gamma$  e ACE, appaiono buoni candidati.

**Scopo dello studio:** investigare la possibile associazione dei polimorfismi PPAR $\gamma$ 2Pro12Ala e ACE I/D con i componenti della Sindrome Metabolica e se sia presente una interazione tra queste due comuni varianti genetiche

**Materiali e metodi:** sono stati arruolati 364 soggetti, afferenti consecutivamente al nostro ambulatorio. I soggetti erano tutti di origine caucasica e privi di legami di parentela.

Sono state misurate la circonferenza vita, la pressione arteriosa e il BMI di ciascun soggetto. La composizione corporea è stata stimata mediante impedenziometria. La Sindrome Metabolica è stata diagnosticata in accordo con i criteri dello NCEP-ATPIII. È stato prelevato un campione di sangue per la determinazione dei parametri biochimici e l'isolamento del DNA per la genotipizzazione dei polimorfismi Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2 e ACE I/D.

**Risultati:** i portatori di un allele Ala del PPAR $\gamma$ 2 Ala (XA) hanno mostrato un BMI e una massa grassa significativamente maggiore ma una pressione sistolica significativamente più bassa. Non abbiamo rilevato differenze nella circonferenza vita o negli altri componenti della sindrome metabolica. Il polimorfismo Pro12Ala appare un predittore indipendente della circonferenza vita. I soggetti con differenti genotipi del gene ACE non differivano in termini di BMI, circonferenza vita, pressione arteriosa, glicemia, insulina o in termini di profilo lipidico. La prevalenza della Sindrome metabolica non differiva nei soggetti con diverso genotipo di PPAR $\gamma$ 2 o ACE ID. Abbiamo trovato una interazione significativa tra PPAR $\gamma$ 2 gene-sesso nella modulazione del BMI, della massa grassa e della pressione sistolica.

Abbiamo individuato un genotipo PPAR $\gamma$ -ACE a rischio per il BMI e la massa grassa che vede i portatori del genotipo ACE DD/ PPAR $\gamma$  XA avere un BMI (p=0,05) e massa grassa (p=0,054) significativamente più elevati.

**Conclusioni:** I soggetti portatori del genotipo PPAR $\gamma$ 2 Ala hanno BMI e massa grassa significativamente più elevati ma non un peggior profilo metabolico, probabilmente grazie ad una disposizione del tessuto adiposo più favorevole. L'effetto del polimorfismo Pro12Ala non è sostanziale nei due sessi. Esiste una interazione tra questi polimorfismi sulla modulazione del BMI e della massa grassa. Ulteriori studi sono necessari per definire il ruolo e il contributo del polimorfismo Pro12Ala sulla distribuzione del tessuto adiposo.

## **EFFECT OF PPAR $\gamma$ PRO12ALA AND ACE I/D POLYMORPHISM ON BMI, FAT DISTRIBUTION AND OTHERS NCEP ATPIII METABOLIC SYNDROME COMPONENTS**

**Context:** Metabolic Syndrome is believed to be attributable to the combined effect of genetic and environmental factors. Adipose tissue related genes, PPAR $\gamma$  and ACE are good candidates.

**Objective:** Investigate the possible association of PPAR $\gamma$ 2Pro12Ala and ACE I/D polymorphisms with Metabolic Syndrome and whether there is an interaction between these two genetic variants

**Design and Setting:** Cross sectional study

**Participants:** 364 patients, consecutively referred to our outpatients clinic, were enrolled. Subjects were unrelated of Caucasian origin.

**Outcome:** Waist circumference, blood pressure and BMI were recorded and body composition was estimated by impedance analysis. Metabolic syndrome was diagnosed according to NCEP-ATPIII criteria. A blood sample was obtained for glucose, insulin, lipid profile determination and DNA isolation for Pro12Ala PPAR $\gamma$  2 and ACE I/D genotyping.

**Results:** Carriers of a PPAR $\gamma$ 2 Ala allele (XA) show a significantly higher BMI and fat mass but a significantly lower systolic blood pressure. No difference in waist circumference and other metabolic features were detected. Pro12Ala is an independent predictor of waist circumference. Subjects carrying different ACE polymorphism did not differ in terms of BMI, waist, blood pressure, glucose and insulin levels and lipid profile. Metabolic syndrome prevalence was not different in subjects with different PPAR $\gamma$ 2 or ACE ID polymorphisms. A significant PPAR $\gamma$ 2 gene-gender interaction was observed in the modulation of BMI, fat mass and systolic blood pressure with a weak association in men. A PPAR $\gamma$ -ACE risk genotype combination for BMI and fat mass was identified with ACE DD/ PPAR $\gamma$  XA having a higher BMI ( $p=0,05$ ) and Fat Mass ( $p=0,054$ ).

**Conclusions:** Subjects carrying a PPAR $\gamma$ 2 Ala allele have higher BMI and fat mass but not a worse metabolic profile, probably because a more favorable distribution of adipose tissue. Pro12Ala polymorphism effect on BMI is not constant across genders. It exist a gene interaction between the two common polymorphism Pro12Ala and ACE I/D on BMI and fat mass. Further studies are needed to assess the real contribute of Pro12Ala polymorphism in determining adipose tissue distribution.

# INDICE

<b>PARTE GENERALE.....</b>	<b>3</b>
INTRODUZIONE.....	5
<i>L'obesità: epidemiologia e classificazione.....</i>	<i>5</i>
<i>Obesità le cause .....</i>	<i>7</i>
<i>Sindromi genetiche a trasmissione mendeliana (sindromi pleiotropiche) .....</i>	<i>9</i>
<i>Obesità monogeniche da alterazione della via leptina-melanocortina.....</i>	<i>10</i>
Deficit congenito della leptina.....	11
Deficit del recettore per la leptina.....	12
Deficit di POMC.....	12
Deficit del recettore MC4 .....	12
Deficit di pro ormone convertasi-I.....	12
<b>OBESITÀ POLIGENICA .....</b>	<b>13</b>
Valutazione di SNP nei geni dell'obesità monogenica .....	14
<b>LA SINDROME METABOLICA.....</b>	<b>16</b>
Cenni storici e definizione.....	16
Sindrome metabolica e rischio cardiovascolare: il ruolo centrale del tessuto adiposo .....	19
Tessuto adiposo e PPAR $\gamma$ : un gene chiave nella modulazione della sensibilità insulinica .....	21
Tessuto adiposo, adipochine e aterosclerosi .....	24
<i>PPAR<math>\gamma</math>e sensibilità insulinica: Indizi derivanti da studi sull'uomo.....</i>	<i>27</i>
Studio delle varianti genetiche .....	27
Mutazioni rare.....	27
Polimorfismo Pro12Ala.....	29
<b>FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (SRAA) NEL TESSUTO ADIPOSO.....</b>	<b>32</b>
Polimorfismo I/D e ipertensione arteriosa .....	35
Polimorfismo I/D e malattie cardiovascolari.....	35
Polimorfismo I/D, Obesità, sindrome Metabolica e INSulino Resistenza.....	35
<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>37</b>
INTRODUZIONE.....	39

SCOPO DELLO STUDIO .....	41
MATERIALI E METODI .....	41
<i>Soggetti</i> .....	41
<i>Analisi Biochimiche</i> .....	42
<i>Genotipizzazione</i> .....	42
<i>Analisi Statistica</i> .....	43
RISULTATI.....	45
<i>Tabella 1</i> .....	47
<i>Tabella 2</i> .....	48
<i>Tabella 3</i> .....	49
<i>Tabella 4</i> .....	50
DISCUSSIONE .....	53
BIBLIOGRAFIA.....	57

## PARTE GENERALE



## INTRODUZIONE

### L'OBESITÀ: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAZIONE

L'obesità è una malattia cronica caratterizzata da un eccesso di peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo, in misura tale da influire negativamente sullo stato di salute.

La prevalenza dell'obesità ha raggiunto negli ultimi decenni livelli epidemici nel mondo occidentale <sup>(1)</sup>. I dati di prevalenza fra i soggetti adulti (età compresa fra 20 e 74 aa), raccolti dal National Health And Nutrition Examination Surveys (NHANES) dal 1960 al 2000, indicano che nel 1974 l'obesità colpiva circa il 14.5% della popolazione statunitense mentre nel 1999 i soggetti colpiti erano il 30.9% <sup>(2)</sup>. I dati dell' NHANES Continuous indicano che nel 1999-2000 il 64.5% degli statunitensi adulti sono in sovrappeso ( $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ). L'analisi dei dati per sesso indica che il 12.1% dei maschi durante il rilievo del NHANES I era obeso mentre l'obesità colpiva il 16.6% delle femmine <sup>(2)</sup>; il rilievo 1999-2000 mostra che i maschi obesi sono 27.7% mentre le femmine obese sono il 33.4% <sup>(2)</sup>. Il sovrappeso, definito come  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , colpisce il 61.9% di tutte le donne di età  $\geq 20$  anni ed il 67.2% degli uomini. Fra le donne si osserva un progressivo incremento della prevalenza del sovrappeso all'aumentare dell'età di osservazione, mentre il picco massimo di prevalenza dell'obesità si osserva tra i 60-69 aa (42.5%) con una riduzione di prevalenza dell'obesità all'aumentare dell'età di osservazione (19.5% nelle donne di età  $\geq 80$  aa) <sup>(2)</sup>. Da questi dati si può ipotizzare che le donne in sovrappeso sopravvivono meglio delle donne magre, mentre l'essere obese riduce la sopravvivenza.

Come negli altri paesi industrializzati, anche in Italia la prevalenza dell'obesità e del sovrappeso è in forte aumento. L'indagine Multiscopo ISTAT 2000 riporta che nel 1999 il 33,1% degli Italiani era in sovrappeso e il 9,7% era obeso. Il sovrappeso è più diffuso tra gli uomini (41%) rispetto alle donne (25,7%), mentre per l'obesità le differenze sono minori (9,5% per gli uomini e 9,9% per le donne). La frequenza delle due condizioni aumenta con l'età con un massimo tra 55 e 64 anni per l'obesità e tra 65 e 74 anni per il sovrappeso, specialmente nel sesso femminile.

L'Obesità viene attualmente classificata utilizzando l'indice di massa corporea o BMI calcolato come il rapporto tra il peso in kg e l'altezza in metri elevata al quadrato ( $\text{kg/m}^2$ ). Nella popolazione adulta si definisce sovrappeso un valore di BMI compreso tra 25.0 e 29.9  $\text{Kg/m}^2$ , mentre valori  $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$  sono indicativi di obesità <sup>(3)</sup> (Tabella 1).

**TABELLA 1. CLASSIFICAZIONE DI SOPRAPPESO ED OBESITÀ BASATA SULL'INDICE DI MASSA CORPOREA (BMI) E SULLA CIRCONFERENZA VITA, E RISCHIO RELATIVO PER MALATTIE ASSOCIATE (DM TIPO2, IPERTENSIONE ARTERIOSA, CVD).**

	Valori BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	Uomini ≤102 cm Donne ≤88 cm	Uomini >102 cm Donne >88 cm
Sottopeso	< 18.5	-	-
Normale	18.5-24.9	-	-
Sovrappeso	25.0-29.9	Aumentato	Alto
Obesità Classi			
I	30.0-34.9	Alto	Molto alto
II	35.0-39.9	Molto alto	Molto alto
III (obesità estrema)	≥40	Estremamente alto	Estremamente alto

Anche la distribuzione del tessuto adiposo in diversi depositi anatomici ha implicazioni sulla morbilità. In particolare, il grasso intraddominale e sottocutaneo addominale correla più strettamente con le complicanze metaboliche dell'obesità come l'insulino-resistenza, il diabete mellito (DM), l'ipertensione arteriosa, l'iperlipemia ed in ultima analisi con il rischio cardiovascolare globale.

L'obesità comporta un enorme costo sociale in termini di spesa sanitaria, è infatti una condizione in grado di ridurre la qualità e l'aspettanza di vita e che si associa frequentemente a diverse condizioni morbose riassunte nella tabella 2.

**TABELLA 2. PREVALENZA DELLE PATOLOGIE ASSOCIATE AD OBESITÀ**

Malattia	Prevalenza (%)
Diabete mellito di tipo 2	61
Carcinoma uterino	34
Patologia della colecisti	30
Osteoartriti	24
Iipertensione	17
Coronaropatia	17
Carcinoma della mammella	11
Carcinoma del colon	11

L'incremento ponderale è chiaramente associato ad un incremento pressorio e nel Framingham Heart Study è stato dimostrato che l'obesità è uno dei maggiori determinanti dell'ipertensione (<sup>4</sup>). Analogamente sovrappeso e obesità sono correlati all'incremento dei livelli sierici di colesterolo, soprattutto nelle donne. I trigliceridi e il colesterolo sono aumentati solitamente nei soggetti con obesità addominale (<sup>5</sup>; <sup>6</sup>) mentre l'aumento del BMI è negativamente correlato con i livelli di c-HDL e positivamente con i livelli di LDL (<sup>5</sup>; <sup>7</sup>).

L'insieme dei fattori di rischio cardiovascolare associati all'obesità rende conto del fatto che la coronaropatia, insieme alle altre patologie di tipo aterosclerotico (come lo stroke e l'arteriopatia periferica) rappresenta uno dei problemi più significativamente correlati all'obesità. Ad esempio il rischio aumenta del 72% per le coronaropatie fatali e non negli uomini di mezza età con un BMI di 25-29 Kg/m<sup>2</sup> (<sup>8</sup>). Dallo studio Nurses'Health emerge anche che il sovrappeso può incrementare il rischio di stroke ischemico ma non di quello emorragico (<sup>9</sup>).

Parallelamente all'obesità, anche il diabete tipo 2 ha avuto un aumento esplosivo della sua incidenza e prevalenza negli ultimi decenni (<sup>2</sup>). Questa patologia con le sue complicanze micro e macro vascolari è gravata da un'eccedenza di mortalità. Esiste una stretta relazione epidemiologica fra obesità e diabete, caratterizzato dal punto di vista fisiopatologico dall'insulino-resistenza. L'incidenza della malattia diabetica aumenta in maniera importante per valori di BMI superiori a 25 Kg/mq.

Esistono evidenze che il sovrappeso e l'obesità siano associate ad un eccesso di neoplasie, in particolare del carcinoma endometriale, renale, della colecisti, del colon e mammario (<sup>10</sup>). L'obesità è un fattore di rischio per lo sviluppo di apnee ostruttive del sonno e della conseguente ipertensione polmonare; Il rischio aumenta per valori di BMI superiori a 30 Kg/m<sup>2</sup> (<sup>11</sup>).

Infine, per il carico meccanico derivante dall'eccesso ponderale, i soggetti obesi presentano una maggiore incidenza di disturbi osteoarticolari (<sup>12</sup>) sulla cui patogenesi potrebbero giocare un ruolo anche le citochine rilasciate dal tessuto adiposo (<sup>13</sup>).

#### OBESITÀ LE CAUSE

La genesi dell'obesità è prettamente multifattoriale. Fattori genetici, ambientali, sociali, culturali, intervengono in vario modo a costituirne il quadro clinico con le sue caratteristiche e la sua evoluzione, rendendone complessa l'interpretazione patogenetica.

Sebbene i fattori ambientali hanno contribuito fortemente negli ultimi decenni all'imponente aumento dell'obesità nelle società industrializzate e in quelle in via di sviluppo, è innegabile l'esistenza di una predisposizione genetica. È intuitivo pensare che membri di uno stesso gruppo familiare abbiano un peso corporeo simile. Ne sono prova numerose osservazioni ormai storiche<sup>(14)</sup>. Recenti studi epidemiologici mostrano che il peso della madre prima della gravidanza, e quello che si acquisisce nei mesi di gestazione è di fondamentale importanza nel rischio successivo di obesità per le figlie<sup>(15)</sup>. Altri dati epidemiologici come quello dello Iowa Women's Health Study dimostrano che anche la distribuzione del tessuto adiposo risente di fattori genetici: in questo ampio studio prospettico condotto su 41837 donne di età compresa tra i 55 e i 69 anni, si è osservata una discreta correlazione tra il rapporto vita-fianchi (waist-hip ratio, WHR) delle madri e quello delle figlie e tra il WHR delle sorelle, giovani o anziane<sup>(16)</sup>.

Anche gli studi su gemelli e fratelli adottati dimostrano l'importanza della genetica nell'obesità. In un ampio studio condotto su oltre 4000 coppie di gemelli la concordanza del BMI tra le coppie di monozigoti (MZ) è risultata molto evidente, ed è rimasta sostanzialmente invariata nel tempo a differenza dei gemelli dizigoti (DZ)<sup>(17)</sup>. Tale concordanza si manteneva anche analizzando gemelli cresciuti e vissuti in differente ambiente di vita<sup>(18)</sup>. In breve, si evidenzia come la concordanza del BMI è molto maggiore con i genitori biologici che con i genitori adottivi<sup>(19)</sup>.

Attualmente ci sono più di 50 regioni del genoma umano che sono state identificate come probabilmente correlate all'obesità ed oltre 244 geni che quando mutati, o espressi come transgeni nel modello animale, causano una alterazione del peso corporeo e dell'adiposità<sup>(20)</sup>.

In conclusione esistono singole mutazioni che causano obesità (obesità monogenica) tuttavia queste forme di obesità sono rare, molto severe e in genere hanno inizio durante l'infanzia<sup>(21,22)</sup>.

Nelle forme comuni di obesità (obesità poligenica) sembra probabile che numerosi varianti genetiche interagiscono con un ambiente "a rischio". Il contributo di ogni singolo gene coinvolto, preso singolarmente, sembra essere modesto tuttavia in presenza di condizione ambientali predisponenti (eccessiva alimentazione, ridotta attività fisica, cambiamenti ormonali, e fattori socio-economici...) l'insieme di queste alterazioni può condurre al fenotipo obesità.

SINDROMI GENETICHE A TRASMISSIONE MENDELIANA (SINDROMI PLEIOTROPICHE)

Esistono circa 30 disordini di tipo Mendeliano che presentano l'obesità come una caratteristica clinica, spesso associata a ritardo mentale, dismorfismi e anomalie di sviluppo organo-specifiche (sindromi pleiotropiche). Qualche esempio, con i relativi geni implicati, viene riportato nella Tabella 3.

**TABELLA 3. ESEMPI DI OBESITÀ SINDROMICHE A TRASMISSIONE EREDITARIA**

	<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>Trasmissione</b>	<b>Loci genetici</b>
<i>Prader-Willi</i>	Ipotonia neonatale Ritardo mentale Iperfagia Ipogonadismo Statura bassa	Autosomica dominante imprinting	15q11-13 Delezione paterna 75% Disomia uniparentale materna Microdelezione al locus SNURF-SNRPN
<i>Bardet-Biedl</i>	Ipogonadismo Retinopatia pigmentaria Polidattilia Ritardo mentale	Autosomica recessiva. Eredità triallelica	BBS da 1 a 9 e altri Proteine Chaperonin MKKS(cromosoma 20) Esprese nelle cellule ciliate
<i>Alstrom</i>	Miocardiopatia Deficit sensoriali (retinopatia, sordità) Dislipidemia, diabete	Autosomica recessiva	2p14 ALMS1 Ubiquitariamente espressa a bassi livelli
<i>Borjson- Fossmann- Lehman</i>	Obesità morbigena, epilessia, ipogonadismo, di smorfia facciale	Legata cromosoma X	al Xq26.3
<i>Cohen</i>	Obesità, sviluppo mentale ritardato, facies caratteristica, mani e piedi sottili	Autosomica recessiva	COH1 ubiquitariamente espressa

Numerosi studi sono stati fatti per identificare i geni e le mutazioni responsabili di queste malattie. Le forme più conosciute sono la sindrome di Prader-Willi, di Cohen, di Alström, e di Bardet-Biedl, ma molte altre sono state riportate (<sup>23,24</sup>). In particolare sono stati caratterizzati i geni responsabili per la sindrome di Bardet-Biedl e di Alström. Perché queste disfunzioni conducano ad obesità è ancora oggetto di dibattito.

## OBESITÀ MONOGENICHE DA ALTERAZIONE DELLA VIA LEPTINA-MELANOCORTINA

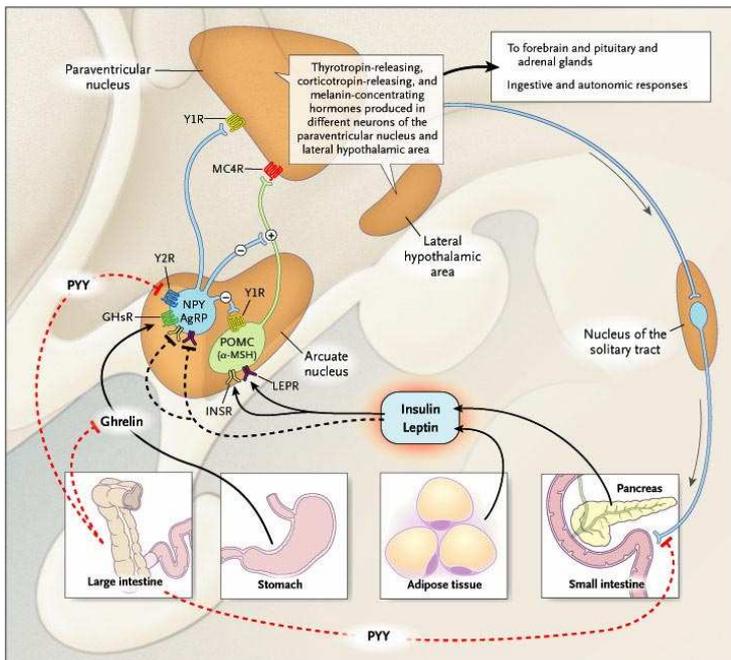


FIGURA 1 FIGURA 2 INTEGRAZIONE A LIVELLO IPOTALAMICO DEI SEGNALI PROVENIENTI DALLA PERIFERIA NELLA REGOLAZIONE A LUNGO TERMINE (INSULINA E LEPTINA) E A BREVE TERMINE DELL'OMEOSTASI ENERGETICA DELL'ORGANISMO.

Il controllo dell'omeostasi energetica è complesso ed è garantito dall'integrazione a livello ipotalamico di numerosi segnali provenienti dalla periferia e principalmente dal tessuto adiposo (leptina), dalle cellule  $\beta$ -pancreatiche (insulina), dall'intestino (Peptide YY, GhRelina, CCK, GLP-I) (<sup>25,26</sup>). Questi ultimi in particolare sembrano coinvolti nella regolazione a breve termine dell'introito calorico e possono mediare una risposta di tipo anoressizzante (PYY, il peptide-I glucagone-simile (GLP-I) e la colecistochinina (CCK), o oressizzante

stimolatori dell'appetito (Ghrelina), vedi figura 1.

La leptina (codificata dall'omologo umano del gene *ob*), secreta dagli adipociti in proporzione al loro contenuto di grasso, va in circolo e si lega ai suoi recettori (codificati dall'omologo umano del gene *db*) presenti a livello del nucleo arcuato dell'ipotalamo. La leptina stimola l'attività dei neuroni POMC con aumento a cascata della produzione di  $\alpha$ -MSH che, legandosi al suo recettore specifico cerebrale (MC4R), riduce l'assunzione di cibo. Al contrario, in condizioni di riduzione del tessuto adiposo, e quindi di riduzione dei livelli di leptina, vengono attivati i neuroni NPY/AgRP con produzione di NPY, un neurotrasmettitore ad attività oressizzante.

Negli ultimi anni sono state identificate le mutazioni di 5 geni coinvolti in questa via (leptina e suo recettore, POMC, MC4R e pro-ormone convertasi-I o PCI) responsabili di obesità monogenica (<sup>21</sup>).

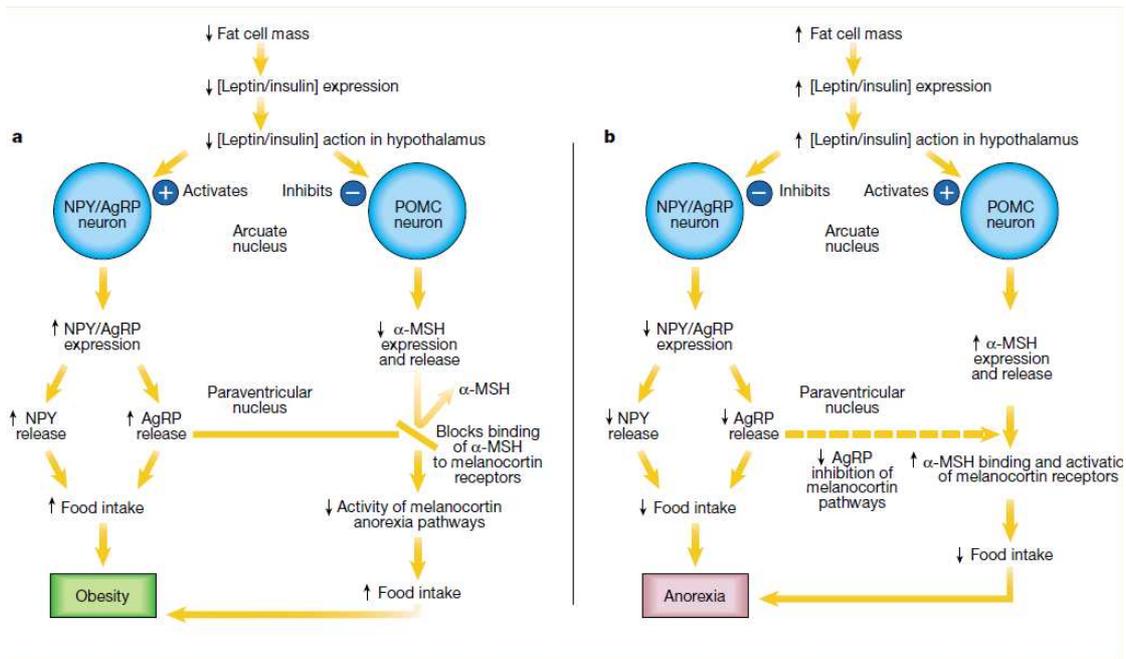


FIGURA 2 RUOLO DEI NEURONI DEL NUCLEO ARCUATO NELLA REGOLAZIONE DELL'OMESOTASI ENERGETICA DELL'ORGANISMO

### DEFICIT CONGENITO DELLA LEPTINA

Nel 1997 è stato descritto un caso di obesità severa riscontrata in due cugini (una bambina dell'età di 8 anni con peso di 86kg e un bambino di 2 anni con peso di 29 kg) di origine pachistana (27). Nonostante la loro grave obesità, entrambi i bambini presentavano livelli indosabili di leptina sierica ed erano portatori omozigoti per una mutazione del gene *ob* che codificava per una proteina anomala che non veniva secreta. Successivamente sono stati individuati quattro altri

individui omozigoti per la stessa mutazione provenienti da tre diverse famiglie, tutte di origine pachistana (28). È stata descritta una grande famiglia turca portatrice di un'altra mutazione omozigote del gene *Ob* (29).

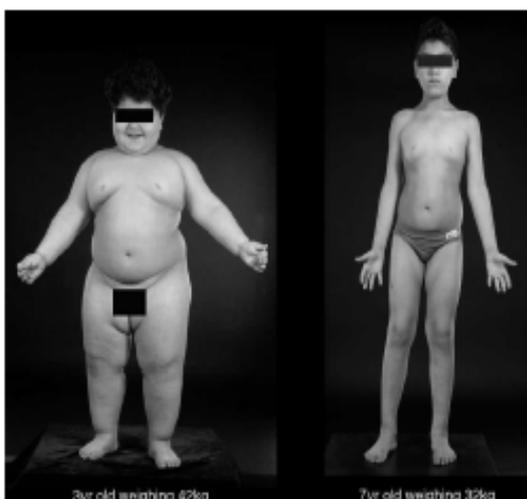


FIGURA 3. RISPOSTA ALLA TERAPIA CON LEPTINA IN UN BAMBINO CON DEFICIT DI LEPTINA

S. O'Rhailly e collaboratori hanno inoltre dimostrato che la terapia sostitutiva con leptina di questi soggetti si è dimostrato in grado di ridurre il peso corporeo (per il 98% massa grassa) in tre bambini con deficit congenito di leptina (28). Emblematico è l'esempio

dell'effetto del trattamento sostitutivo con leptina su di un bambino di 3 anni, seriamente limitato dalla grave obesità (peso di 42kg), che dopo 48 mesi di trattamento pesa 32 kg (Figura 3).

#### DEFICIT DEL RECETTORE PER LA LEPTINA

È stata descritta una mutazione, nel gene che codifica per il recettore della leptina, in una famiglia di origine algerina con tre soggetti affetti (<sup>30</sup>). Questi erano risultati essere omozigoti per una mutazione che taglia il recettore prima del dominio transmembrana. Il fenotipo dei soggetti con deficit del recettore per la leptina risulta essere molto simile a quello dei soggetti con deficit di leptina; i primi presentano anche un normale peso alla nascita, ma mostrano un rapido aumento nelle prime settimane di vita, con grave iperfagia e comportamento aggressivo quando viene negato il cibo.

#### DEFICIT DI POMC

Sono stati descritti sette bambini portatori omozigoti o eterozigoti per una mutazione nel gene della POMC (<sup>31</sup>). La prima manifestazione è nel periodo neonatale con crisi iposurrenaliche dovute al deficit di ACTH (la POMC è un precursore dell'ACTH nell'ipofisi), e i bambini presentano cute pallida e capelli rossi dovuti alla mancanza dell'azione dell'MSH sui recettori per la melanocortina-I presenti su cute e follicoli dei capelli. Il deficit di POMC ha come conseguenza l'iperfagia e l'obesità ad insorgenza precoce dovuti alla perdita del segnale della melanocortina sui recettori MC4. Lievi alterazioni di tale via sono sufficienti a determinare obesità, come suggerisce la sua elevata prevalenza in parenti eterozigoti di bambini con completo deficit di POMC.

#### DEFICIT DEL RECETTORE MC4

La prevalenza di questo deficit è stimata intorno a 0,5-1% in obesi adulti fino al 6% in individui con severa obesità ad esordio infantile (<sup>32</sup>). La sua trasmissione sembra essere di tipo autosomico co-dominante, ed è caratterizzata da espressività variabile e penetranza ridotta. L'obesità è più severa nei pazienti omozigoti rispetto agli eterozigoti.

I pazienti con deficit di MC4R mostrano, rispetto ai portatori del deficit di leptina, iperfagia di minore gravità e ad esordio più precoce e un incremento della massa magra e della densità minerale delle ossa. Tali effetti sembrano essere conseguenza di un eccessivo e precoce iperinsulinismo (<sup>32</sup>).

#### DEFICIT DI PRO ORMONE CONVERTASI-I

Questa alterazione è stata descritta in forma eterozigote in una donna affetta da severa obesità ad esordio infantile, ipogonadismo ipogonadotropico, ipoglicemia postprandiale, ipocortisolemia e alterata processazione della POMC e della proinsulina (<sup>33</sup>). In un secondo caso di questo deficit,

riscontrato in un bambino, è stato evidenziato anche un malassorbimento dell'intestino tenue, che è stato messo in relazione ad un deficit di maturazione di propeptidi contenuti nelle cellule neuroendocrine intestinali (<sup>34</sup>).

## OBESITÀ POLIGENICA

Classicamente il peso della componente genetica nell'obesità comune è stata indagata attraverso studi di associazione su geni candidati e studi di linkage. Questi studi cercano di individuare se esista una associazione tra la forma allelica di un determinato gene e l'obesità, attraverso un'analisi sistematica di tutti i cromosomi nelle famiglie di soggetti obesi. L'analisi viene condotta senza conoscere preventivamente la funzione dei geni indagati e ha lo scopo di identificare geni predisponenti l'obesità, siano essi già noti o sconosciuti. I geni possono essere localizzati e infine clonati. Queste indagini sono state svolte su diverse popolazioni in tutto il mondo e hanno portato all'individuazione di almeno sette geni localizzati sui cromosomi 2, 5, 6, 10,11,19 e 20 (<sup>20</sup>). Pochi geni tuttavia sono stati confermati in diverse popolazioni.

La complessità del quadro che scaturisce da questi studi è evidente sotto molteplici aspetti. Praticamente più di 200 loci cromosomici, ad eccezione di quelli situati sul cromosoma Y, sono stati messi in relazione a diversi fenotipi come la massa grassa, la distribuzione del tessuto adiposo, l'insorgenza di sindrome metabolica, il consumo energetico a riposo, l'assunzione di macronutrienti e di energia, le variazioni di peso e i livelli circolanti di leptina ed insulina. In secondo luogo sono descritte interazioni tra diverse regioni cromosomiche. Appare inoltre estremamente difficile mantenere un quadro aggiornato di tutti i loci correlati all'obesità, soprattutto perché molti risultati sono non significativi e scarsamente riproducibili (20). Questo soprattutto a causa del fatto che la maggior parte di questi studi erano deboli per quanto riguarda il disegno dello studio, la copertura dei geni o la mancanza di potere statistico.

Il "Genome-wide association", l'ultima strategia per la ricerca di geni sta cambiando la prospettiva della ricerca di geni candidati ed ha già fornito prove positive nel contesto delle malattie complesse. Similmente all'approccio "genome-wide linkage", anche il genome wide association è un approccio privo di un'ipotesi di lavoro, che richiede lo screening dell'intero genoma allo scopo di identificare nuove, anche inaspettate, varianti genetiche associate al tratto/malattia di interesse. Mentre gli studi di linkage si basano sulla co-segregazione di loci cromosomici con una malattia all'interno di famiglie, gli studi "genome-wide association" si basano sulla semplice

associazione tra molte varianti genetiche, in genere single nucleotide polymorphisms (SNPs) e il tratto o la malattia di interesse. Questi studi utilizzano come campione ampie corti di casi e controlli e di conseguenza sono basate su casistiche ben più ampie dei tipici studi di famiglie. Questo nuovo approccio è reso possibile dalla conoscenze acquisite, come il completamento del progetto genoma umano, e il progresso tecnologico che permette di ottenere il genotipo di milioni di SNPs in un singolo esperimento.

Mediante questo approccio recentemente sono stati identificate varianti comuni dei loci di FTO (fat mass and obesity associated) (35; 36) e dell'MC4R (melanocortin 4 receptor) <sup>(37;38)</sup> che associavano con la massa grassa, il peso corporeo e l'obesità in diverse popolazioni. In particolare, per quanto riguarda FTO numerosi studi successivi hanno confermato in maniera convincente il ruolo di questo gene come predisponente all'obesità. Oltre all'associazione con il BMI sembra esistere una associazione anche con altri tratti correlati all'obesità come il peso corporeo, i livelli di leptina, massa grassa, circonferenza vita <sup>(39)</sup>.

Più recentemente un altro studio di genome wide association ha identificato 11 loci associati con le misure di obesità (peso corporeo e BMI). Queste includevano varianti vicine a geni precedentemente identificati (FTO E MC4R) ma identificava almeno altri 7 loci associati all'obesità in corrispondenza dei quali si trovano geni coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso (come BDNF e SH2B1, NEGR1) ma anche nell'apoptosi (come TNF e FAIM 2) <sup>(40)</sup>.

#### VALUTAZIONE DI SNP NEI GENI DELL'OBESITÀ MONOGENICA

Sono stati studiati i geni implicati nelle forme di obesità monogenica come possibili candidati per questi studi, ma non sembra svolgano un ruolo preponderante, rispetto agli altri, nelle forme comuni di obesità. Tuttavia, sono stati valutati in diverse popolazioni, e sono risultati associati a fenotipi diversi di obesità come risulta, ad esempio, per la leptina e il suo recettore <sup>(41)</sup>.

Il gene per la POMC è stato considerato uno dei più forti candidati, e il suo screening ha rilevato la presenza di alcuni polimorfismi, seppur di bassa frequenza, localizzati nelle regioni codificanti e non codificanti <sup>(42)</sup>. In uno studio fatto sugli americani del Messico, tre varianti, risultavano associate con alti livelli di leptina <sup>(43)</sup>. In altre popolazioni, molti polimorfismi individuati nel gene POMC non erano associati a fenotipi di obesità, livelli di leptina, o variazioni del peso, ad eccezione

di due nuove rare mutazioni scoperte (<sup>44</sup>; <sup>45</sup>). La frequenza della mutazione Arg236Gly era moderatamente aumentata in un gruppo di bambini inglesi, e le analisi funzionali mostravano che la mutazione impediva la normale processazione della  $\beta$ MSH e della B endorfina, producendo una aberrante fusione delle proteine. Questo peptide era responsabile della ridotta attivazione del recettore MC4, nonostante fosse in grado di legarsi ad esso (<sup>44</sup>).

## LA SINDROME METABOLICA

### CENNI STORICI E DEFINIZIONE

La sindrome metabolica è un'entità clinica sostanzialmente eterogenea, rappresentata dalla coesistenza di alterazioni multiple, che riguardano l'obesità, in modo particolare l'obesità addominale, l'alterata tolleranza glucidica, la dislipidemia (alti livelli di trigliceridi e bassi livelli di HDL) e l'ipertensione arteriosa. La prevalenza di queste alterazioni è differente tra i sessi, nelle diverse età e in differenti gruppi etnici. Esistono tuttora alcuni problemi relativi alla definizione e alla diagnosi di sindrome metabolica: le componenti proposte sono variabili continue e per quanto sia necessario stabilire un valore di cut-off, non esiste tuttavia un consenso sugli specifici valori per stabilire la diagnosi di ciascuna componente; queste variabili sono sicuramente interrelate, ma la fisiopatologia delle loro relazioni non è ancora chiaramente compresa; è ancora dibattuto se includere o meno insulino-resistenza e diabete tra le componenti diagnostiche e se includere altre variabili (tipo quelle concernenti l'infiammazione o la coagulazione). Una delle questioni attualmente molto dibattuta è se la sindrome metabolica insorga a causa dell'insulino-resistenza oppure a causa dell'obesità.

Anche la difficoltà di trovare un consenso riguardo ad un nome ricorda quanto ancora si sia lontani da un accordo unanime riguardo a tale sindrome. È stata chiamata sindrome plurimetabolica <sup>(46)</sup>, sindrome metabolica <sup>(47)</sup>, sindrome X <sup>(48)</sup>, quartetto mortale <sup>(49)</sup>, sindrome da insulino-resistenza <sup>(50)</sup>, sindrome dismetabolica <sup>(51)</sup>.

La descrizione della sindrome metabolica ed il tentativo di standardizzarne i criteri diagnostici hanno una storia che risale ai primi del '600 ma che tuttora tiene vivace il dibattito. Fu Nicolaes Tulp (1593-1674) per primo, ad Amsterdam, a descrivere un caso di sindrome da ipertrigliceridemia <sup>(52)</sup>. Tulp stabilì il nesso tra ipertrigliceridemia ed ingestione di acidi grassi saturi ("latte puro nel sangue"), obesità e tendenza al sanguinamento (da ipertensione?). Non solo, egli suggerì un approccio terapeutico corretto indicando una riduzione nell'apporto di acidi grassi saturi, riconobbe inoltre l'associazione tra aterosclerosi precoce e morte improvvisa.

Circa 250 anni dopo, Morgagni descrisse molto chiaramente l'associazione tra obesità viscerale, ipertensione, iperuricemia, aterosclerosi e sindrome delle apnee ostruttive notturne, molto tempo prima che la sindrome metabolica e la sindrome delle apnee ostruttive notturne venissero definite <sup>(53)</sup>. Nel 1923 Kylin descrisse l'associazione contemporanea di ipertensione, iperglicemia e

iperuricemia<sup>(54)</sup>. Vague fu il primo ad riconoscere l'importanza dell'"obesità androide", proponendola come condizione spesso associata a "diabete, aterosclerosi e gotta"<sup>(55; 56)</sup>.

La frequente presenza simultanea di obesità, iperlipidemia, diabete e ipertensione fu descritta innanzitutto da Avogaro et al. nel 1967<sup>1</sup>. In questo lavoro, venne riportato come l'alto rischio di malattia coronarica fosse associato alla presenza di sindrome metabolica e complicanze vascolari. L'associazione tra questi fattori fu successivamente descritta, nel 1977 da Haller et al., che per primo utilizza il termine "sindrome metabolica" e ne descrive l'associazione con l'aterosclerosi<sup>(47)</sup>. In un lavoro del 1947 e successivamente nel 1956 Vague suggerisce il concetto che la massa grassa ha di per sé scarso effetto sulla progressione dell'obesità verso il diabete, ma sarebbe la predominanza di grasso nella parte alta del corpo che porterebbe a diabete ed aterosclerosi. Egli ricorda inoltre che l'insulinemia e la secrezione di cortisolo nei pazienti obesi è correlata con l'obesità centrale<sup>(56)</sup>. Nel 1988 Reaven introduce il concetto di Sindrome X per identificare il raggruppamento di disturbi riguardanti il metabolismo del glucosio e insulinico, la dislipidemia e l'ipertensione. Reaven suggerì che l'insulino-resistenza, che determina l'iperinsulinemia, caratterizzi questo gruppo di disturbi e rappresenti un importante fattore di rischio cardiovascolare di per sé<sup>(48)</sup>. Occorre ricordare che Reaven, nella sua descrizione, non aveva incluso tra le componenti della sindrome sovrappeso e/o obesità.

Nel 1991, Ferranini et al. suggerirono inoltre che questo insieme di disturbi fosse determinato dall'insulino-resistenza e usarono il termine di "sindrome da insulino-resistenza"<sup>(57)</sup>. Una definizione della sindrome metabolica venne data dal "WHO Working Group on diabetes" nel 1998, poi modificata nel 1999, con una lista di criteri per la diagnosi clinica. In particolare, la definizione del WHO stabilisce che a definire la sindrome metabolica è la presenza di diabete tipo 2 o di alterata tolleranza al glucosio (IGT), insieme ad almeno 2 degli altri 4 fattori (ipertensione, iperlipidemia, obesità e microalbuminuria). In caso di normale tolleranza glucidica (NGT), è necessario evidenziare la presenza di insulino-resistenza misurata durante il clamp euglicemico o con l'indice HOMA (homeostasis model assessment). La definizione di obesità è basata sull'indice di massa corporea (BMI) o sul rapporto tra la circonferenza della vita e la circonferenza dei fianchi (WHR)<sup>(58)</sup>. Nella definizione così come proposta dal WHO vi sono peraltro alcuni punti suscettibili di qualche critica. È ben noto che il BMI non è una reale misura dell'obesità nell'età avanzata, e ciò è dovuto ai cambiamenti di statura con l'avanzare dell'età e al diverso rapporto tra massa grassa e massa magra rispetto al giovane adulto, inoltre il BMI non è informativo circa la distribuzione

corporea del tessuto adiposo. Altro punto: la frequenza di microalbuminuria negli individui non diabetici è molto bassa e, perciò, questo criterio diventa rilevante solo in presenza di diabete. Infine, l'uso della tecnica del clamp euglicemico, il gold standard per la misura dell'insulino-resistenza, non è applicabile negli studi epidemiologici. Vengono usati piuttosto metodi alternativi, quali indice HOMA, insulinemia a digiuno o il test di tolleranza all'infusione di glucosio. Tuttavia, i diversi metodi ed i valori limite utilizzati possono influire sulle differenze riscontrate nella prevalenza di insulino-resistenza. Nel 2001 l'"United States National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (ATPIII) report" propose una serie di criteri simili a quelli proposti dal WHO, eccetto per il fatto che la componente chiave è l'obesità viscerale invece dell'insulino-resistenza. L'ATP III non trova abbastanza evidenze per raccomandare la misura routinaria della sensibilità insulinica o del dosaggio della glicemia a due ore post-carico, ma include semplicemente la determinazione della glicemia a digiuno (<sup>59</sup>). Questa definizione di sindrome metabolica richiede che siano presenti almeno 3 dei seguenti 5 fattori: aumentata circonferenza della vita ( $\geq 102$  cm negli uomini e  $\geq 88$  cm nelle donne), ipertrigliceridemia ( $\geq 150$  mg/dl), basso HDL colesterolo ( $< 40$  mg/dl negli uomini e  $< 50$  mg/dl nelle donne), ipertensione ( $\geq 130/85$  mmHg o trattamento per ipertensione), e glicemia a digiuno  $\geq 110$  mg/dL (o  $\geq 100$  mg/dl, come suggerito dal panel di esperti dell'American Diabetes Association nel 2003) (Tabella 5). Inoltre, l'ATP III raccomanda alcune misure opzionali, come la proteina C reattiva, come marker di stato pro-infiammatorio, e il fibrinogeno, in qualità di marker di stato protrombotico. Tuttavia, i 5 criteri e ed i valori cut-off proposti dall'NCEP- ATP III panel hanno alcuni problemi così come i criteri del WHO. Questi criteri rappresentano un consenso di esperti e non riflettono un processo basato sull'evidenza di dati raccolti sul campo, osservazioni cioè di tipo epidemiologico e che tengono conto dell'influenza per esempio della razza ed ancora più dell'età, sulle singole componenti della sindrome metabolica. Inoltre è possibile che gli attuali criteri subiscano dei cambiamenti allorquando vi saranno maggiori evidenze sul ruolo del fibrinogeno o della proteina C reattiva, che potrebbero quindi venire inclusi come criteri diagnostici.

In genere, studi eseguiti utilizzando le definizioni proposte da WHO e ATP III dimostrano che esse identificano individui con sindrome metabolica con buona sovrapposizione (<sup>60</sup>).

**Tabella 4. Sindrome metabolica. Criteri e definizioni:World Health Organizin (WHO),International Diabetes Federation (IDF), United States National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III (ATPIII)**

<b>WHO</b>	<b>IDF</b>	<b>NCEP-ATPIII</b>
Diabete, alterata glicemia a digiuno, alterata tolleranza glucidica o insulino-resistenza	Obesità centrale (definita come CV $\geq$ 94cm per gli uomini europei e $\geq$ 80 cm per le donne europee	
Più almeno 2 dei seguenti fattori	Più almeno 2 dei seguenti fattori	Almeno 3 dei seguenti fattori
BMI $>30$ kg/m <sup>2</sup> , o W/H $>0.9$ nell’uomo e $>0.85$ nella donna	Ridotta concentrazione di HDL: $<40$ g/dl negli uomini, $<50$ mg/dl nelle donne o specifica terapia	CV: uomini $>102$ cm donne $> 88$ cm
TG $\geq$ 150 mg/d, HDL $<$ 35 mg/dl negli uomini e $<39$ nelle donne	TG $\geq$ 150mg/dl o specifica terapia per questa alterazione	TG $\geq$ 150mg/dl, HDL $<$ 40 mg/dl negli uomini e $<50$ nelle donne
Trattamento anti ipertensivo o pressione arteriosa $\geq$ 160/90 mmHg	Pressione arteriosa $\geq$ 130/85 mmHg, o pregressa diagnosi di ipertensione in trattamento	Pressione arteriosa $\geq$ 130/85 mmHg
Albuminuria $\geq$ 20 $\mu$ g/min	Glicemia a digiuno ( $\geq$ 100 mg/dl) o pregressa diagnosi di diabete tipo2	Glicemia a digiuno $>110$ mg/dl

**NB. TRIGLICERIDI (TG), CIRCONFERENZA VITA (CV), INDICE DI MASSA CORPOREA (BMI), RAPPORTO VITA-FIANCHI (W/H).**

**SINDROME METABOLICA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE: IL RUOLO CENTRALE DEL TESSUTO ADIPOSO**

L’attenzione della comunità scientifica, che ha mosso ingenti risorse economiche verso lo studio della fisiopatologia dell’obesità negli ultimi anni, è determinata dal fatto che l’obesità quasi invariabilmente si associa ad altri fattori di comorbilità come il diabete, la dislipidemia, ed in ultimo la malattia cardiovascolare che costituisce una delle principali cause di morte nei paesi industrializzati ed una delle più importanti voci in termini di costi per la salute pubblica.

Per decenni il tessuto adiposo è stato considerato un organo che passivamente accumula, sotto forma di trigliceridi, l'eccesso di energia introdotta con gli alimenti. Tale visione è stata completamente sovvertita dagli studi compiuti negli ultimi decenni che hanno dato all'adipocita ed al tessuto adiposo la dignità di un nuovo organo endocrino in grado di partecipare attivamente all'omeostasi energetica in toto dell'organismo. Il tessuto adiposo è in grado di rispondere a stimoli di derivazione centrale e a fattori circolanti, integrando quindi segnali da altri organi e rispondendo mediante la secrezione di un gran numero di sostanze metabolicamente attive che globalmente costituiscono le adipochine o adipocitochine. Alla famiglia delle adipocitochine appartengono proteine ma anche molecole non proteiche che possono avere effetti su diversi organi e processi fisiologici come sulle funzioni endocrine (leptina, ormoni sessuali, fattori di crescita) sul sistema immunitario (leptina, fattori del complemento) bilancio energetico (leptina, acidi grassi liberi, adiponectina, resistina...) e sistema cardiovascolare.

Il tessuto adiposo deve quindi essere visto come un organo che attivamente partecipa a numerosi processi fisiologici, in grado di "comunicare" con altri organi ed influenzarne la funzione. Allo stesso modo è comprensibile come lo stesso tessuto adiposo, quando mal funzionante, sia in grado di compromettere la funzionalità di altri organi.

Di fronte ad un eccessivo introito di energia, l'adipocita è in grado di immagazzinare lipidi andando incontro a modificazioni di dimensioni drammatiche a seconda delle esigenze metaboliche. Tale aumento di dimensione dell'adipocità, che segue ad un cronico eccesso di energia introdotta con gli alimenti, non comporta una sola modificazione morfologica dell'adipocita ma anche una modificazione di tipo funzionale ed una modificazione del pattern di secrezione delle adipochine. Il tessuto adiposo, quando costituito da adipociti ipertrofici, è più insulino-resistente e mostra un pattern di secrezione che contribuisce al mantenimento ed alla progressione dell'insulino-resistenza. Diversi studi, in differenti modelli di obesità, genetici e indotti dalla dieta, hanno dimostrato una correlazione positiva tra dimensioni degli adipociti e insulino-sensibilità (<sup>61;62</sup>).

Sebbene le conseguenze di un eccessivo peso corporeo siano note da tempo è solo nelle ultime decadi che è emersa la stretta relazione tra obesità ed in particolare l'obesità viscerale e l'insulino-resistenza (<sup>63</sup>) e si è giunti alla identificazione di una entità nosologica eterogenea strettamente associata all'obesità ed alla insulino-resistenza e caratterizzata dalla associazione di numerose alterazioni metaboliche come la ridotta tolleranza glucidica, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia. Tale entità, denominata sindrome X, sindrome da insulino-resistenza o sindrome

metabolica è associata con un elevato rischio di sviluppare la malattia cardiovascolare ed i soggetti portatori di tale sindrome presentano un rischio maggiore di quello derivato dalla semplice somma dei singoli fattori di rischio noti (<sup>64,65</sup>). Il tessuto adiposo svolge un ruolo chiave nello sviluppo della sindrome metabolica in quanto protagonista importante nella genesi e nel mantenimento dell'insulino-resistenza.

#### TESSUTO ADIPOSO E PPAR $\gamma$ : UN GENE CHIAVE NELLA MODULAZIONE DELLA SENSIBILITÀ INSULINICA

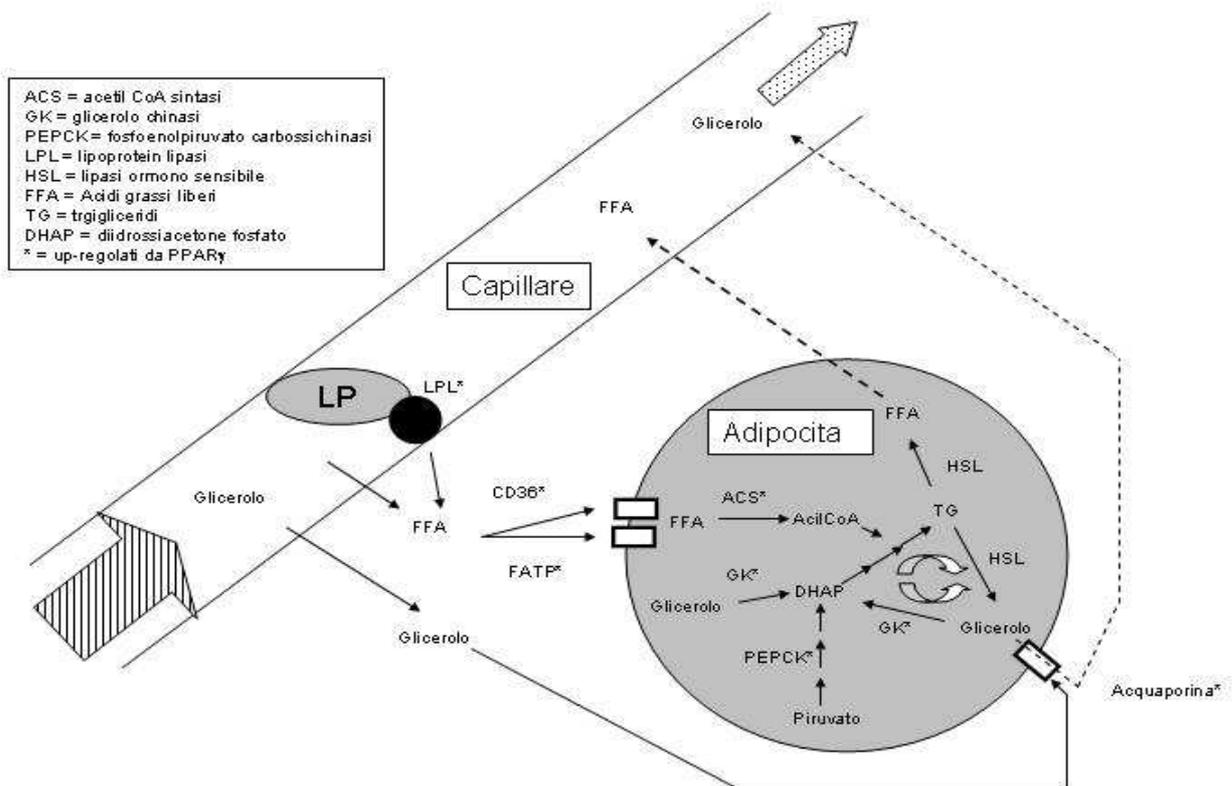
Negli anni 80, screening su larga scala di composti chimici identificarono la classe dei tiazolinedioni (TZD) come potenti agenti ipoglicemizzanti ed in grado di migliorare il profilo lipidico di modelli animali con diabete ed obesità (<sup>66</sup>).

L'evidenza che la molecola bersaglio dei tiazolinedioni era il PPAR $\gamma$ (<sup>67</sup>) pose questo recettore al centro della regolazione dell'omeostasi energetica dell'organismo. Nella successiva decade, un gran numero di evidenze sperimentali ha confermato l'importanza del PPAR $\gamma$  come mediatore del cross-talk metabolico tra tessuti insulino-sensibili e lo studio di tale recettore nucleare, analizzando mutazioni spontanee identificate nell'uomo, e mediante l'utilizzo di animali geneticamente modificati (<sup>68</sup>), ha fornito importanti indizi sul meccanismo di azione dei TZD e informazioni su come il tessuto adiposo modulare la sensibilità insulinica dell'organismo. Altre importanti conoscenze sulla fisiologia dell'adipocita e sulla funzione delle adipochine derivano dall'osservazione della severa insulino-resistenza che si osserva sia nell'uomo in corso di lipodistrofia e nel topo reso geneticamente lipoatrofico e che rivela l'importanza di una normale quantità di tessuto adiposo nel mantenimento di una normale omeostasi glucidica (<sup>69</sup>). Le anomalie metaboliche che si osservano nei soggetti e negli animali lipodistrofici possono essere dovute alla mancanza di adipochine ma soprattutto all'esposizione di organi diversi dal tessuto adiposo ad elevate concentrazione di acidi grassi non più accumulati nell'adipocita. Quest'ultimo fenomeno, che si traduce in una alterazione della funzione e del signaling insulinico di popolazioni cellulari diverse dall'adipocita, è generalmente noto con il termine di lipotossicità. Modelli murini di completa (<sup>70</sup>) o incompleta (<sup>71</sup>) lipoatrofia mostrano un accumulo ectopico di grassi a livello del fegato e del muscolo scheletrico con un quadro di severa insulino-resistenza che evolve in diabete (<sup>72</sup>). Il trapianto di tessuto adiposo bianco in questi roditori riduce i livelli circolanti degli acidi grassi e l'esposizione di altri tessuti agli acidi grassi migliorando drammaticamente la sensibilità insulinica ed i parametri correlate (<sup>73</sup>). In maniera simile, anche il trattamento di questi animali con

singole adipochine, come la leptina, ha prodotto effetti simili (<sup>74</sup>). Il tessuto adiposo impiantato quindi migliora il fenotipo non solo svolgendo la funzione di accumulatore di acidi grassi con conseguente riduzione dei livelli circolanti ma anche costituendo una fonte di adipochine che possono influenzare la funzione di altri organi. Anche i soggetti lipodistrofici mostrano un simile quadro di insulino-resistenza e dislipidemia: soggetti portatori di una mutazione nel gene del PPAR $\gamma$  presentano, ad esempio, un quadro di lipodistrofia parziale selettiva con sviluppo precoce di sindrome metabolica caratterizzata da una importante insulino-resistenza, dislipidemia, ipertensione arteriosa, epatosteatosi ed in ultimo sviluppano precocemente una malattia cardiovascolare (<sup>75</sup>).

Un importante ruolo del tessuto adiposo è quindi quello di accumulare gli acidi grassi preservando altri organi dalla esposizione a eccessive concentrazioni di acidi grassi. Quando l'accumulo di trigliceridi è eccessivo e quindi in corsi di obesità il tessuto adiposo diviene tuttavia più insulino-resistente<sup>61</sup>. A livello del tessuto adiposo l'insulino-resistenza (come in corso di obesità) ma anche la carenza assoluta o relativa di insulina (come in corso di diabete) si traduce in : 1) una riduzione dell'uptake di acidi grassi e di glucosio insulino-mediato (<sup>76</sup>) e 2) una ridotta soppressione del rilascio di glicerolo e acidi grassi liberi (FFA) nella fase postprandiale (<sup>77</sup>). Questo incremento nel flusso di FFA verso altri organi quale il tessuto muscolare scheletrico il fegato ed il pancreas, quando protratto, può tradursi in lipotossicità e peggiorare e sostenere lo stato di insulino-resistenza. Il trattamento con TZD comporta una riduzione degli FFA circolanti (<sup>78</sup>) e comporta anche una modificazione delle dimensioni dell'adipocita. L'attivazione del PPAR $\gamma$  porta alla trascrizione di un set di geni che in ultima si traduce in un maggiore efficienza dell'adipocita nel captare e immagazzinare sotto forma di trigliceridi gli acidi grassi circolanti. Ad esempio la lipoproteinlipasi (<sup>79</sup>), che agisce a livello della superficie cellulare ed idrolizza i trigliceridi contenuti nei chilomicroni, il CD36 e FATP (<sup>80</sup>), che mediano l'uptake degli acidi grassi liberi all'interno dell'adipocita e acil-CoA sintasi (<sup>81</sup>) sono tutti geni up-regolati dal PPAR $\gamma$ . Al contrario geni che controllano la lipolisi ed il rilascio di acidi grassi come  $\beta_3$ -recettori adrenergici (<sup>82</sup>) e la leptina (<sup>83</sup>) sono repressi dal PPAR $\gamma$ . Allo scopo di immagazzinare gli acidi grassi liberi all'interno dell'adipocita è richiesto inoltre il glicerolo. Il glicerolo può derivare sia dal pool circolante o attraverso la gliceroloneogenesi. Il processo limitante di questa reazione è catalizzato dalla fosfoenolpiruvato carbossi kinasi (PEPCK) anch'essa regolata dal PPAR $\gamma$  (<sup>84;85</sup>). E' ragionevole quindi ipotizzare che il tessuto adiposo, quando normalmente funzionante, assicuri che la maggior parte degli acidi grassi liberi siano catturati in maniera efficiente dagli adipociti, prevenendo l'esposizione di altri tessuti

insulino-sensibili come il fegato e il muscolo scheletrico agli acidi grassi. Nell'obesità tale fine regolazione dell'immagazzinamento degli acidi grassi da parte degli adipociti, in funzione dello stato nutrizionale, viene meno, rendendo il metabolismo lipidico relativamente inflessibile alle fluttuazioni dello stato nutrizionale. Di conseguenza, i livelli medi di FFA circolanti sono elevati instaurando uno stato di lipotossicità che è un elemento chiave nella patogenesi dell'insulino-resistenza e quindi della sindrome metabolica e delle sue complicanze. Vi sono dati che evidenziano come vi sia uno stretto parallelismo tra la progressione dell'insulino-resistenza e la progressione della malattia aterosclerotica sottolineando come le stesse molecole di derivazione adipocitaria possono allo stesso tempo determinare modificazioni nel segnale insulinico e contribuire allo stato infiammatorio della parete vascolare (<sup>86</sup>). In questo parallelismo alla iperinsulinemia, e poi alla insulino-resistenza, corrisponde a livello endoteliale la comparsa della disfunzione endoteliale(<sup>87</sup>). Successivamente, quando all'insulino-resistenza si associano altri membri della sindrome metabolica, come la dislipidemia e l'ipertensione, a livello endoteliale compaiono lesioni di tipo infiammatorio con aumento degli eventi trombotici e ossidazione a livello della parete vasale. Con la progressione dell'insulino-resistenza la mortalità per malattia coronarica aumenta di 2 volte quando compare una ridotta tolleranza glucidica e di 4 volte nei soggetti con diabete tipo 2 (<sup>88</sup>) per la comparsa di placche ateromasiche instabili.



**FIGURA 4 AZIONI DEL PPAR $\gamma$  CHE PROMUOVONO L'INTRAPPOLAMENTO DEGLI ACIDI GRASSI NELL'ADIPOCITA.**

#### TESSUTO ADIPOSO, ADIPOCHINE E ATEROSCLEROSI

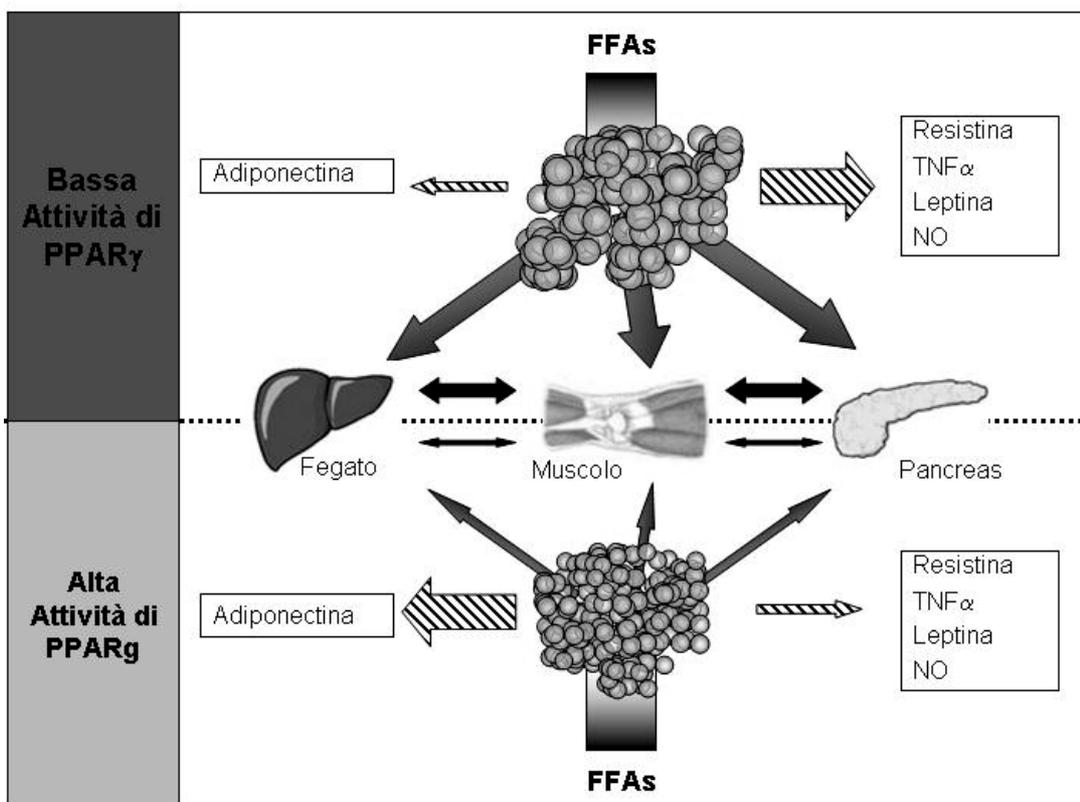
Gli acidi grassi forniscono un interessante collegamento tra il tessuto adiposo e altri organi insulino-sensibili; il tessuto adiposo è tuttavia in grado di elaborare un ampio numero di molecole con attività autocrina, paracrina e endocrina. Il termine "adipocitochine" è stato coniato per queste molecole che possono essere in maniera semplicistica divise tra quelle che comportano un miglioramento della sensibilità insulinica (come leptina e adiponectina) e quelle che invece la peggiorano (come TNF $\alpha$ , resistina, e ossido nitrico).

Oltre alla più nota relazione tra il tessuto adiposo e insulino-resistenza che pone il tessuto adiposo come uno dei protagonisti principali nella patogenesi della sindrome metabolica, negli ultimi anni sempre più evidenze sottolineano inoltre che le molecole prodotte dall'adipocita siano anche in

grado di modificare direttamente la funzione endoteliale e di modulare la risposta immunitaria contribuendo alla produzione del pool circolante delle proteine di fase acuta.

Vi sono evidenze <sup>(89)</sup> che l'insulino-resistenza possa condurre alla comparsa della disfunzione endoteliale così come i mediatori dell'infiammazione secreti dal tessuto adiposo <sup>(90)</sup>.

Due delle adipochine prodotte dal tessuto adiposo, la leptina e l'adiponectina, sembrano avere un ruolo principale sugli effetti cardiovascolari. La correlazione tra elevate concentrazioni di leptina e lo sviluppo dell'aterosclerosi è stato dimostrato da studi sperimentali <sup>(91)</sup> e da osservazioni su modelli animali <sup>(92)</sup>.



**FIGURA 5** POTENZIALI MECCANISMI ATTRAVERSO I QUALI L'ATTIVAZIONE DEL PPAR $\gamma$  PORTA AD UN AUMENTO DELLA SENSIBILITÀ INSULINICA. OLTRE ALLA RIDUZIONE DELLE DIMENSIONI DEGLI ADIPOCITI, AL MIGLIORAMENTO DEL PROFILO DI SECREZIONE DELLE ADIPOCHINE ED ALL'AUMENTATO IMMAGAZZINAMENTO DI LIPIDI NEL TESSUTO ADIPOSO, PPAR $\gamma$  POTREBBE INOLTRE PERMETTERE L'ACCUMULO DI LIPIDI NEL FEGATO, PREVENENDO QUINDI LA LIPOSSICITÀ A LIVELLO MUSCOLARE E DELLE BETA CELLULE. AL TEMPO STESSO LA PERDITA DI PPAR $\gamma$  IN UNO DI QUESTI ORGANI SI TRADUCE IN MODIFICAZIONI DELLA SENSIBILITÀ INSULINICA NEGLI ALTRI.

Gli stessi acidi grassi possono modificare la funzione endoteliale: un aumentato rilascio di FFA nella fase post prandiale è stato messo in relazione alla disfunzione endoteliale associata ad un

pasto ad alto contenuto di grassi <sup>(93)</sup>. Allo stesso modo una infusione in acuto di intralipid in soggetti sani comporta la comparsa di disfunzione endoteliale <sup>(94)</sup>.

Il classico ormone di derivazione adipocitaria è la leptina, clonata nel 1994 <sup>(95)</sup>. Questo ormone, citochina-simile, è secreta in maniera proporzionale alla massa grassa totale ed è stata ben caratterizzata come un inibitore dell'introito calorico a livello centrale. Agendo soprattutto attraverso il sistema nervoso autonomico, la leptina è in grado anche di indurre un aumento del dispendio energetico e dell'ossidazione dei lipidi in vari tessuti <sup>(96)</sup>. Ci sono inoltre alcune evidenze che suggeriscono una azione diretta della leptina a livello del fegato e del muscolo scheletrico, ove è in grado di promuovere il catabolismo degli acidi grassi <sup>(97;98)</sup>. Ci sono recettori per la leptina sugli adipociti stessi e sulle cellule beta del pancreas. Evidenze dell'importanza della leptina nell'omeostasi glucidica derivano dalle osservazioni su topi privi di tessuto adiposo o lipodistrofici, nei quali la sensibilità all'insulina aumenta drammaticamente dopo infusione di leptina <sup>(74)</sup>. A sostegno di queste osservazioni è stato inoltre dimostrato che nel topo lipoatrofico A-ZIP/F1, i miglioramenti metabolici che derivano dal trapianto di tessuto adiposo, non si osservano quando il donatore del tessuto sia un topo ob/ob, il cui tessuto è incapace di sintetizzare e secernere leptina <sup>(99)</sup>.

Altre molecole secrete dal tessuto adiposo possono contribuire all'aumentato rischio di sviluppare malattie cardiovascolari dei soggetti obesi. Il tessuto adiposo è la principale sede extraepatica di produzione dell'angiotensinogeno, molecole precursore dell'angiotensina. Il livelli circolanti di angiotensinogeno sono elevati nei soggetti obesi <sup>(100)</sup>. Lo studio di animali transgenici ha permesso di chiarire il ruolo dell'angiotensinogeno prodotto dal tessuto adiposo: animali che iper esprimono l'angiotensinogeno a livello del tessuto adiposo presentano aumentati livelli circolanti di angiotensinogeno, ipertensione ed un aumento della massa del WAT. Quanto lo stesso tipo di manipolazione viene effettuata in animali knock out per l'angiotensinogeno, che presentano una riduzione della massa grassa ed ipotensione, il ripristino dell'espressione a livello del tessuto adiposo è sufficiente a ripristinare normali livelli di massa grassa e di pressione arteriosa <sup>(101)</sup>. L'angiotensinogeno prodotto dal tessuto adiposo potrebbe quindi essere in grado di favorire l'insorgere dell'ipertensione nei soggetti obesi. L'aumento dei livelli di angiotensinogeno potrebbe inoltre avere un effetto trofico sul tessuto adiposo, probabilmente attraverso l'azione dell'angiotensina II a livello del tessuto adiposo <sup>(102)</sup>.

Diversi studi hanno dimostrato che l'obesità svolge anche un ruolo diretto sul danno vascolare (<sup>103</sup>), ma ancora dibattuti sono i principali meccanismi patogenetici che determinano questo effetto.

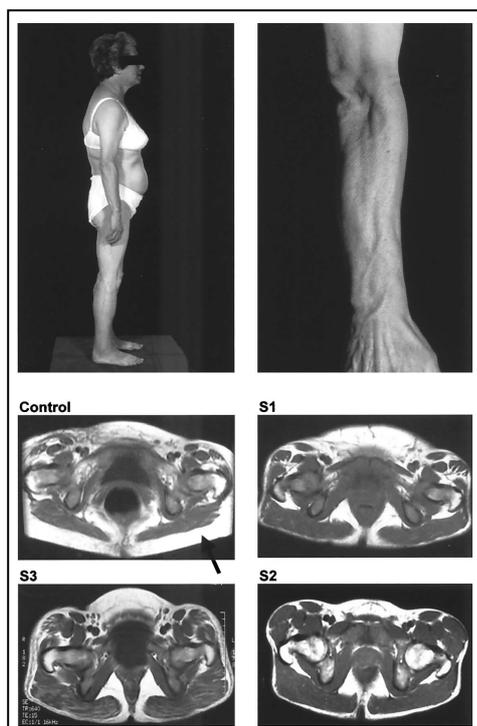
#### PPAR $\gamma$ E SENSIBILITÀ INSULINICA: INDIZI DERIVANTI DA STUDI SULL'UOMO

Sebbene i modelli murini abbiano stabilito l'utilità del trattamento con agonisti di PPAR $\gamma$  nel trattamento di condizioni di insulino-resistenza e diabete tipo 2 nell'uomo, è necessaria una certa cautela nell'applicare i dati di questi modelli animali alla fisiopatologia umana. Le principali fonti di dati sull'uomo derivano dai trials clinici sugli agonisti del PPAR $\gamma$  e gli studi su soggetti portatori di mutazioni del gene del PPAR $\gamma$  in grado di alterarne la funzione.

#### STUDIO DELLE VARIANTI GENETICHE

##### MUTAZIONI RARE

##### PPAR $\gamma$ P467L E V290M



**FIGURA 6. TIPICO PATTERN DI LIPODISTROFIA PARZIALE DEI SOGGETTI P467L, CON ATROFIA DELLA COMPONENTE SOTTOCUTANEA E CONSERVAZIONE DELL'ADIPOSITÀ VISCERALE**

Tre gruppi indipendenti hanno recentemente identificato queste due mutazioni nel Ligand binding domain (LBD) del PPAR $\gamma$  umano (<sup>104;105;106</sup>). Nel complesso questi lavori descrivono 8 individui che esibiscono tutti una forma stereotipata di lipodistrofia parziale accompagnata da una severa insulino-resistenza. Tale insulino-resistenza è presente anche nella prima infanzia nei soggetti affetti (<sup>107</sup>).

In tutti i pazienti si osservava la mancanza di tessuto adiposo a livello degli arti e dalla regione gluteale, con conservazione della componente adiposa dell'addome, sia sottocutanea che viscerale mentre alcune differenze erano presenti a livello della distribuzione del tessuto adiposo

facciale, da alcuni autori riportato ridotto, da altri aumentato o inalterato. Sebbene questi dati confermino il ruolo importante svolto dal PPAR $\gamma$  nell'adipogenesi, rimane difficile da conciliare il quadro di lipodistrofia parziale e

selettiva, con quanto è noto circa l'espressione di PPAR $\gamma$  a livello del tessuto adiposo e la risposta agli agonisti di questo recettore.

Poiché sia i quadri di lipodistrofia parziale che totale sono fortemente associati con la presenza di insulino-resistenza sia nell'uomo che nei roditori<sup>108</sup>, è molto probabile che la drammatica riduzione del tessuto adiposo degli arti e gluteale contribuisca alla severa insulino-resistenza osservata in questi pazienti. Inoltre anche il tessuto adiposo residuo in questi pazienti è metabolicamente inerte, con incapacità di regolare il flusso di FFA a muscolo e fegato<sup>107</sup>. I dati provenienti dagli studi dei topi con ablazione tessuto specifica del PPAR $\gamma$ , con e senza lipodistrofia, permettono di speculare che la presenza di questa forma dominante negativa di PPAR $\gamma$  nel fegato e muscolo di questi soggetti, renda questi organi incapaci di tamponare l'eccessiva presenza di FFA, anomalie di questi tessuti possono quindi contribuire significativamente al quadro di severa insulino-resistenza osservato in questi soggetti.

Sebbene lo studio nell'uomo del "dialogo" metabolico tra diversi tessuti insulino-sensibili sia reso difficile dalla mancanza di modelli di delezione tessuto specifica di specifici geni, il recente riscontro di un soggetto con severa insulino-resistenza su base digenica può offrire una opportunità importante per questo tipo di investigazione<sup>(109)</sup>: in questo soggetto in età infantile, la combinazione di una mutazione frameshift nel gene del PPAR $\gamma$  (risultante in un allele nullo) ed una mutazione con stop prematuro nella glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 (PPP1R3A) muscolo specifica, cosegregano con un quadro di severa insulino-resistenza mentre entrambe le mutazioni singolarmente non sembrano avere alcun effetto sulla sensibilità insulinica, almeno nel ristretto numero di pazienti descritti fino ad ora. Poiché PPAR $\gamma$  è rappresentato prevalentemente nel tessuto adiposo e PPP1R3A è espresso a livello del muscolo scheletrico e cardiaco, ulteriori studi di questi soggetti, e di modelli animali analoghi, potrebbero contribuire a chiarire i meccanismi alla base del dialogo metabolico tra diversi tessuti insulino-sensibili. Questo bambino rappresenta inoltre un primo passo in avanti, da modelli di insulino-resistenza monogenica, verso modelli oligo- o poli-genici che costituiscono la maggior parte dei casi di insulino-resistenza e diabete.

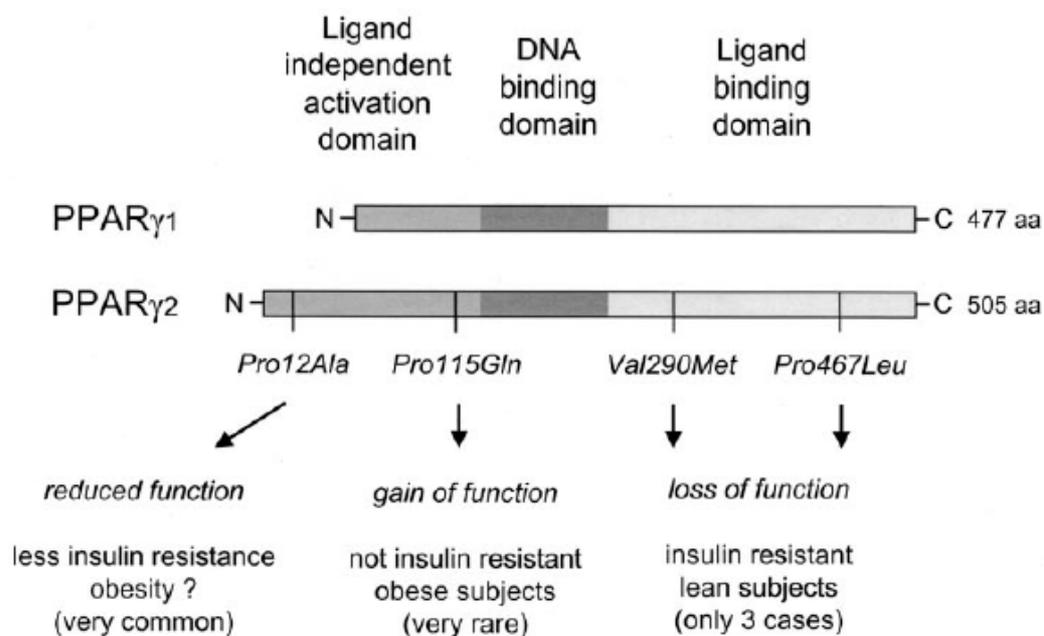
### PPAR $\gamma$ P115G

Considerato che le mutazioni con perdita di funzione comportano lipodistrofia e che gli agonisti del PPAR $\gamma$  promuovono l'adipogenesi, è lecito attendersi che mutazioni del PPAR $\gamma$  con guadagno di funzione possano portare ad un incremento del peso corporeo. Sono stati identificati 4 soggetti

affetti da obesità morbigena, che sono eterozigoti per una sostituzione di prolina con glutamina nelle porzione N-terminale del PPAR $\gamma$ 2 (<sup>110</sup>). Questa mutazione è adiacente ad un sito di fosforilazione del PPAR $\gamma$  che media la riduzione dell'attività trascrizionale (<sup>111</sup>). La mutazione interferisce con questa fosforilazione, con il risultato di un recettore con attività trascrizionale costitutiva ed aumentata attività adipogenica, in vitro (<sup>110</sup>). Tuttavia non sono disponibili studi di segregazione e non sono state trovate mutazioni simili in screening su larga scala di soggetti obesi. Inoltre il fenotipo di questi soggetti, contrasta con quanto riscontrato sul modello murino portatore di una mutazione nel sito di fosforilazione del PPAR $\gamma$ : il peso di questi animali non differiva da quello della controparte wild type ed inoltre, gli animali sembravano protetti dall'insulino-resistenza secondaria ad una dieta ad alto contenuto di grassi.

### POLIMORFISMO PRO12ALA

Le mutazioni riportate fino ad ora sono estremamente rare e sebbene abbiano contribuito, con i fenotipi estremi osservati nei soggetti affetti, a chiarificare il ruolo del PPAR $\gamma$  nella omeostasi glucidica nell'uomo, non possono certo contribuire al rischio di sviluppare il diabete nella popolazione generale. Al contrario la variante genetica di gran lunga più frequente del PPAR $\gamma$  è un polimorfismo in cui l'alanina rimpiazza la prolina a livello del codone 12 della porzione amino terminale del PPAR $\gamma$ 2 (Figura 7).



**FIGURA 7 EFFETTI DI VARI POLIMORFISMI SULL'ATTIVITÀ DEL PPAR $\gamma$ 2.**

La frequenza allelica di tale variante raggiunge il 15% in alcune popolazioni di origine caucasica (<sup>112;113</sup>). I livelli di espressione del PPAR $\gamma$ 2 sono aumentati nei soggetti con obesità morbigena mentre non si osservano modificazioni nell'espressione del PPAR $\gamma$ 1. Modelli di ablazione specifica delle isoforme suggeriscono che il PPAR $\gamma$ 2 sia la isoforma principalmente coinvolta nell'adipogenesi (<sup>114</sup>). In alcuni studi funzionali, il polimorfismo Pro12Ala, mostra un ridotto legame al DNA con conseguente ridotta attività trascrizionale e queste proprietà sono state correlate con la associazione di questo polimorfismo con un ridotto indice di massa corporea (BMI), sebbene studi successivi abbiano fallito nel confermare questo dato (<sup>113;115</sup>). Evidenze per una associazione tra Pro12Ala ed il diabete tipo 2 furono riportate inizialmente in uno studio in una popolazione finnica, in cui un minor BMI appariva correlare con una migliore sensibilità insulinica in soggetti con l'allele Ala, mentre in un gruppo di giapponesi/americani di seconda generazione il genotipo Pro/Pro era associato con il diabete tipo 2 (<sup>115</sup>).

Tuttavia questa associazione si è dimostrata dapprima difficilmente riproducibile, con un solo studio sui 5 successivi, in grado di evidenziare un legame statisticamente significativo con il rischio di diabete tipo 2 (<sup>116;117;118</sup>). Ciononostante una metanalisi degli studi di associazione confermava un modesto (1,25) ma significativo ( $p=0,002$ ) incremento del rischio di sviluppare diabete nei portatori dell'allele Pro (<sup>112</sup>). La discrepanza tra i differenti studi è probabilmente da mettere in relazione con lo scarso potere statistico di alcuni di essi in termini di numerosità del campione. Quindi se tutta la popolazione fosse portatrice dell'allele Ala, la prevalenza del diabete tipo 2 si ridurrebbe del 25% rendendo quindi il PPAR $\gamma$  il gene più pesantemente coinvolto nella patogenesi del diabete, tra quelli scoperti fino ad ora. Successivamente altri studi hanno confermato questo dato ma è necessario tenere presente il rischio di un publication bias, che tende a favorire la pubblicazione di risultati positivi rispetto a negativi.

Per quanto riguarda gli effetti del genotipo Ala sull'indice di massa corporea, alcuni studi mostrano una riduzione del BMI nei portatori del genotipo Ala (<sup>115</sup>); questo, unito alla minore attività trascrizionale in vitro della variante Ala, conduce alla ipotesi che l'aumento della sensibilità insulinica sia dovuto interamente ad una riduzione nella adiposità. Sebbene ciò sia in accordo con l'osservazione che il PPAR $\gamma$ 2 svolga un ruolo principe nell'adipogenesi (<sup>114</sup>) e con il dato che la massa grassa corporea è uno dei principali determinanti della sensibilità insulinica, successivi studi

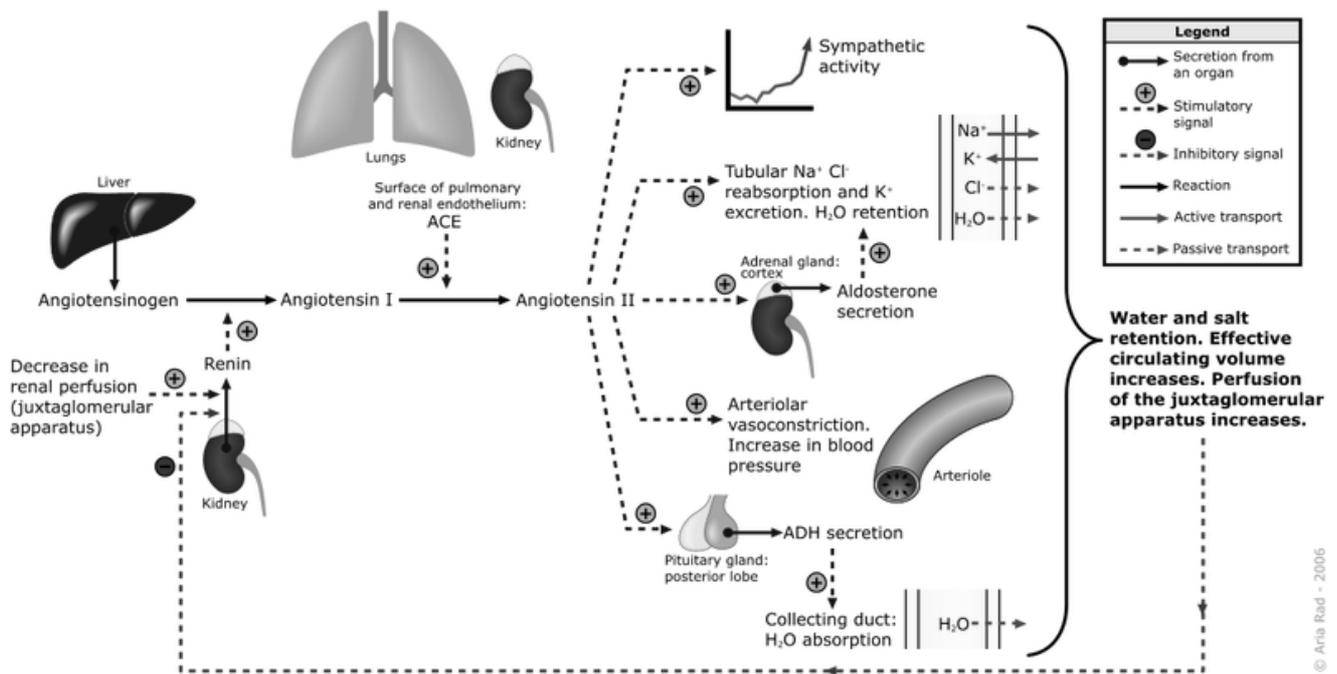
hanno fallito nel confermare questi dati e diversi autori hanno riportato un aumento del BMI nei soggetti con allele Ala (<sup>119;120</sup>).

A rendere ancora più complesso il quadro in uno studio viene riportato che il BMI nei portatori dell'allele Ala è influenzato anche dalle variazioni nel contenuto di acidi grassi polinsaturi e saturi nella dieta (<sup>121</sup>).

Considerati gli effetti pleiotropici del PPAR $\gamma$  sono presenti in letteratura numerosi dati circa un presunto ruolo del polimorfismo Pro12Ala anche in altre patologie nell'uomo come il cancro, o la Mal. di Alzheimer. L'insieme delle evidenze sul ruolo del polimorfismo Pro12Ala nella patologia umana è stato oggetto di una recente revisione della letteratura (<sup>122</sup>).

FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (SRAA)  
NEL TESSUTO ADIPOSO.

E' noto da tempo come il sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA) giochi un ruolo importante nella regolazione della pressione arteriosa e dell'omeostasi renale degli elettroliti.



© Arta Rad - 2006

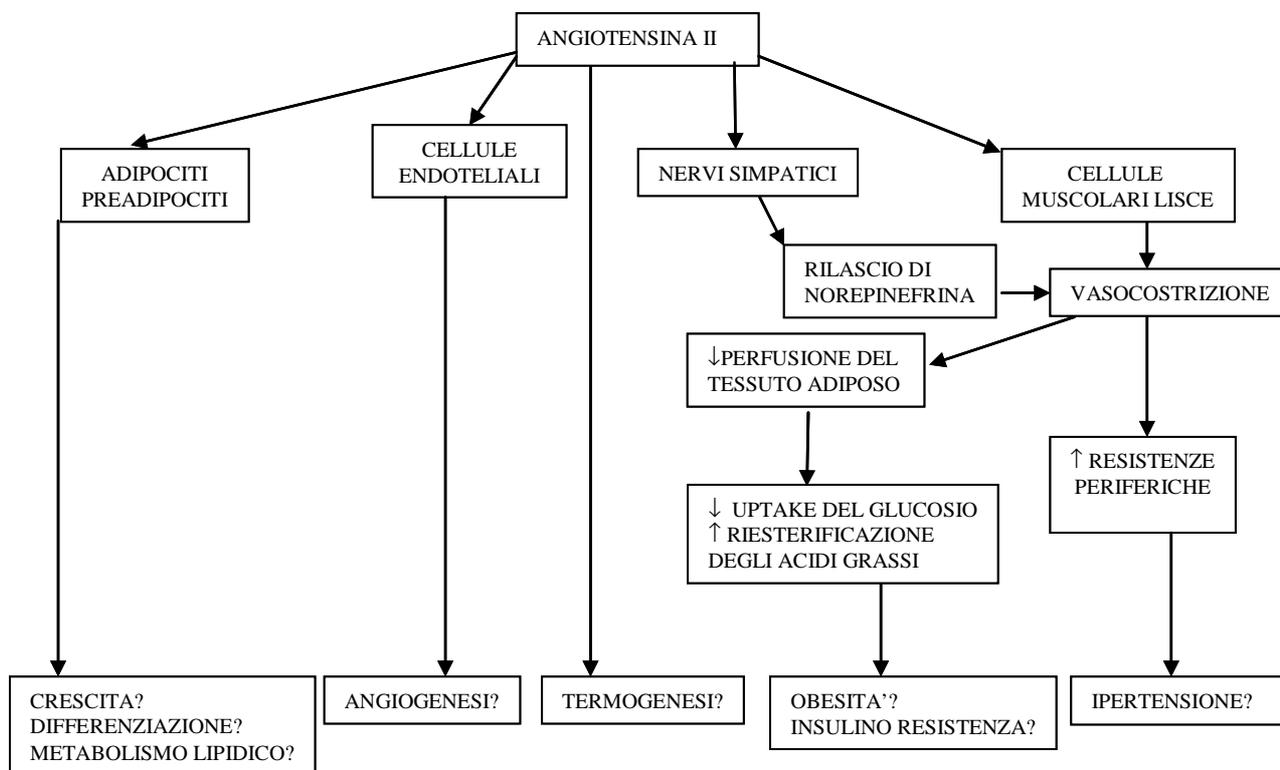
**FIGURA 8. MECCANISMO DI AZIONE DEL SISTEMA RENINA/ANGIOTENSINA/ALDOSTERONE.**

I componenti del sistema sono stati isolati in diversi tessuti, come rene, cervello, cuore e vasi sanguigni, dimostrando probabile ruolo nel funzionamento di numerosi organi. un ruolo di regolatore locale del normale funzionamento dei vari organi. In più, lo SRAA è implicato anche nella fisiopatologia del sovertimento strutturale e funzionale di vari organi tramite la modulazione di espressione genica, crescita, fibrosi, e la risposta infiammatoria in alcune condizioni patologiche.

Nel cuore ad esempio è implicato nell'ipertrofia in risposta al carico pressorio e nel rimodellamento del miocardio dopo infarto (<sup>123</sup>).

Negli ultimi anni si è reso evidente che i componenti del sistema renina angiotensina sono espressi anche a livello del tessuto adiposo. Inizialmente è stato dimostrato che l'angiotensinogeno è espresso a livello del tessuto adiposo perivascolare (<sup>124</sup>). In seguito numerose dimostrazioni hanno

mostrato che l'angiotensinogeno viene espresso durante la differenziazione degli adipociti (<sup>125</sup>). Inoltre alcuni studi hanno dimostrato una attività renino simile nel tessuto adiposo (<sup>126</sup>).



**FIGURA 9. SISTEMA RENINA/ANGIOTENSINA: IPOTESI DI AZIONE NEL TESSUTO ADIPOSO.**

Più recentemente diversi ricercatori hanno dimostrato che gli adipociti umani esprimono i geni del sistema renina-angiotensina incluso l'ACE, i recettori AT1e AT2 (<sup>127</sup>). Recenti studi hanno identificato la presenza di recettori della renina a livello del tessuto adiposo umano (<sup>128</sup>) ed anche la presenza di ACE2 (<sup>129</sup>). In sostanza il tessuto adiposo possiede un corredo sufficiente alla sintesi e alla risposta all'angiotensina 2.

L'esatta funzione biologica del RAS a livello del tessuto adiposo non è nota tuttavia l'aumento dell'espressione e della secrezione di angiotensinogeno è una delle caratteristiche della differenziazione dei preadipociti ed è considerata un marcatore tardivo della differenziazione degli adipociti. Nel tessuto adiposo sono stati trovati anche la renina, l'angiotensina II i suoi recettori AT1 e AT2; l'angiotensina 2 potrebbe avere come bersaglio, a livello del tessuto adiposo, fibroblasti, cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, fibre nervose del sistema simpatico, macrofagi e linfociti.

Si è ipotizzato che l'angiotensina II, derivante dal clivaggio dell'angiotensinogeno secreto dagli adipociti maturi, possa avere un'azione paracrina sui recettori AT2, inducendo il rilascio di

prostaglandina I<sub>2</sub>; quest'ultima, è stato dimostrato avere azione promuovente sulla differenziazione delle cellule adipose stesse (<sup>130</sup>, <sup>131</sup>).

Data la dimostrazione della presenza del sistema in un tessuto coinvolto nella patogenesi della sindrome metabolica come il tessuto adiposo, si è indagato il suo possibile ruolo del SRAA nella patogenesi della sindrome metabolica. Inoltre i trial clinici hanno mostrato un probabile effetto "pleiotropico" degli ACE inibitori che sembrano, in alcuni studi in grado di ridurre l'incidenza del diabete tipo 2; non è stato ancora chiarito se tale effetto sia legato all'azione, o sulla sensibilità insulinica, o sul metabolismo del tessuto adiposo (<sup>132</sup>).

Nei soggetti obesi è stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli plasmatici dell'angiotensinogeno, dell'attività reninica e dell'enzima ACE (enzima che converte l'angotensina I in angiotensina II), e l'indice di massa corporea (BMI).

È stato vista anche una relazione significativa tra la pressione arteriosa, il BMI e i livelli plasmatici di angiotensinogeno. Questo potrebbe essere spiegato dal contributo fornito dal tessuto adiposo, per circa un 20%, ai livelli plasmatici di angiotensinogeno (<sup>133</sup>).

La quota adiposa dell'angiotensinogeno si è visto essere regolata in vivo dall'introduzione di cibo

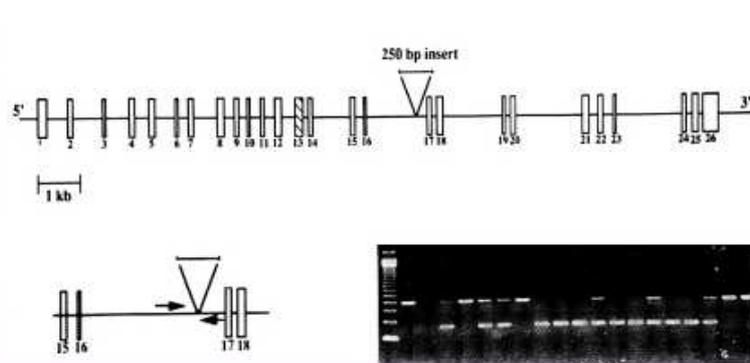


FIGURA 10. POLIMORFISMO INSERZIONE (I)/DELEZIONE (D)

ed in particolare dagli acidi grassi attraverso una regolazione trascrizionale in cui sono implicati anche i PPAR  $\delta$  o  $\gamma$ . Questo meccanismo potrebbe essere un possibile legame tra la regolazione

dell'angiotensinogeno e quindi dell'intero SRAA nel tessuto adiposo, l'introduzione di

cibo e i disordini metabolici legati all'obesità (<sup>134</sup>).

## Studi genetici

Sono state ricercate anche le possibili relazioni tra i polimorfismi delle componenti del SRAA e i vari aspetti della sindrome metabolica stessa.

Il più comune polimorfismo osservato è il polimorfismo inserzione (I) delezione (D) del gene dell'enzima che converte l'angiotensina I in angiotensina II (ACE).

Tale polimorfismo consiste nella presenza (I) o assenza (D) di un frammento di 287 paia di basi nell'introne 16. Le due varianti sono associate a differente attività dell'enzima: in particolare gli omozigoti per l'allele D (DD) hanno un'attività enzimatica doppia rispetto agli omozigoti per l'allele I (II) (<sup>135</sup>).

### POLIMORFISMO I/D E IPERTENSIONE ARTERIOSA

In accordo con l'evidenza di una maggiore attività dell'enzima nei portatori dell'allele D e con la normale funzione dell'enzima e dei suoi prodotti, si sono trovati valori di pressione arteriosa più elevati in soggetti omozigoti per l'allele D (<sup>136</sup>). Tuttavia altri studi non confermano tale associazione (<sup>137; 138</sup>).

### POLIMORFISMO I/D E MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Cambien et al. Furono i primi a dimostrare l'associazione tra il polimorfismo I/D e l'infarto miocardico acuto (IMA); in particolare si evidenziava una più alta prevalenza del genotipo DD nel gruppo con IMA (<sup>139</sup>).

Altri studi a seguire hanno dimostrato questa associazione, come quello condotto su individui cinesi con diabete tipo 2; tale studio ha dimostrato come l'allele D sia un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari; i soggetti omozigoti per tale allele avevano un SRAA maggiormente attivato, erano più soggetti a sviluppare lesioni vascolari, avevano una maggiore prevalenza di dislipidemia e, in particolare, più alti livelli plasmatici di trigliceridi (<sup>140</sup>).

### POLIMORFISMO I/D, OBESITÀ, SINDROME METABOLICA E INSULINO RESISTENZA

Vari studi hanno mostrato una maggiore prevalenza di obesità e valori più elevati di peso e circonferenza vita nei soggetti con genotipo ID o DD (<sup>141</sup>).

In uno studio prospettico si è dimostrata anche un maggiore incremento nel tempo del peso corporeo e dei valori di pressione arteriosa ed una maggiore incidenza di sovrappeso nei soggetti omozigoti DD.

I risultati circa questa associazione sono ancora contrastanti.

Alcuni studi infatti mostrano un'associazione tra insulino-resistenza e l'allele D (<sup>142</sup>) altri invece con l'allele I (<sup>143, 144</sup>) Altri infine mostrano associazione di I con diabete tipo 2, ridotta tolleranza al glucosio (IGT) e sindrome metabolica.

## PARTE SPERIMENTALE



## INTRODUZIONE

Gli studi epidemiologici confermano che l'intolleranza glucidica, l'ipertensione, l'obesità addominale sono frequentemente presenti insieme nello stesso soggetto. Nel 1998, Reaven (<sup>48</sup>) coniò il termine di "Sindrome X" in riferimento a questo cluster di condizioni, evidenziando che l'insulino resistenza potrebbe essere il fattore eziopatogenetico comune per i singoli componenti di questa sindrome.

Il nesso meccanicistico tra insulino resistenza e i fattori di rischio cardiovascolare non è ancora completamente chiarito e appare piuttosto complesso; la maggior parte dei soggetti con insulino-resistenza presentano obesità addominale e una disfunzione del tessuto adiposo potrebbe essere il meccanismo comune alla base dell'aggregazione di questi fattori di rischio nel contesto della sindrome metabolica (MetS).

Elementi che sono generalmente considerati appartenenti a questa sindrome includono l'obesità addominale, la dislipidemia, l'ipertensione, l'insulino resistenza con associata o meno intolleranza glucidica, uno stato pro trombotico e pro infiammatorio e la steatosi epatica.

Tra i differenti criteri diagnostici per la sindrome metabolica, quelli suggeriti dalle linee guida del National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) (<sup>59</sup>) sono facilmente applicabili e identificano soggetti con elevato rischio cardiovascolare, per la presenza di ipertensione arteriosa, dislipidemia aterogena, alterata omeostasi glucidica e obesità viscerale. Appare difficile identificare il singolo contributo di ogni fattore sul rischio di coronaropatia, tuttavia vi è sostanziale accordo nel considerare tale sindrome una condizione di aumentato rischio di CHD e che l'insulino-resistenza che frequentemente si riscontra in questi soggetti, aumenti notevolmente il rischio di sviluppare diabete di tipo 2.

La sindrome metabolica può essere considerata l'espressione dell'effetto combinato di un substrato genetico predisponente con specifici fattori ambientali come la dieta, lo stress, lo stile di vita.

In considerazione del ruolo centrale del tessuto adiposo nella sindrome metabolica, diversi geni correlate all'adipocita sono stati studiati come possibili geni candidati, inclusi il peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e i geni correlati con il sistema renina-angiotensina.

Il PPAR $\gamma$ , un membro della superfamiglia dei recettori ormonali nucleari, regola la trascrizione e quindi l'espressione di numerosi geni coinvolti in una varietà di funzioni biologiche inclusi la crescita, la differenziazione e il metabolismo cellulare.

Si pensa che ligandi endogeni, probabilmente piccole sostanze lipofile, siano in grado di legare PPAR $\gamma$  e promuovere la trascrizione dei geni target (<sup>145; 146</sup>). Il gene del PPAR $\gamma$  nell'uomo consta di 9 esoni dai quali vengono trascritti due isoforme di PPAR $\gamma$  mRNA e proteina, PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2, mediante splicing alternativo (<sup>147</sup>). Il PPAR $\gamma$  1 è espresso abbondantemente a livello del tessuto adiposo, colon e macrofagi, molto meno a livello del muscolo scheletrico del miocardio e altri tessuti (<sup>148</sup>); l'espressione del PPAR $\gamma$  2 invece è sostanzialmente limitata al tessuto adiposo.

Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che il PPAR $\gamma$  svolge un ruolo cruciale nella regolazione della differenziazione adipocitaria e nell'accumulo di lipidi a livello dell'adipocita (<sup>149;150</sup>) ed è inoltre implicato nella regolazione dell'omeostasi glucidica e nella regolazione della sensibilità insulinica (<sup>151</sup>). A conferma di ciò, il PPAR $\gamma$  è stato identificato come il bersaglio molecolare dei tiazolidinedioni (TZD) (<sup>152</sup>), una classe di farmaci sintetici ad azione insulino sensibilizzante. Il ruolo di PPAR $\gamma$  nel determinare la sensibilità insulinica è corroborato da numerosi studi nell'uomo su variati genotipi di PPAR $\gamma$ . Tra queste, la mutazione Pro12Ala del gene del PPAR $\gamma$  2 (Pro12Ala) è sicuramente la più comune. La razza caucasica presenta la frequenza maggiore di tale polimorfismo (12%), seguita dai messicani americani (10%), dagli individui delle West Samoans (8%), gli africani americani (3%) mentre una bassa prevalenza è stata riportata nella popolazione cinese (1%) (<sup>153</sup>). Numerosi studi hanno investigato il possibile ruolo della mutazione Pro12Ala nel determinare l'adiposità con risultati contrastanti. Alcuni autori hanno dimostrato che la variante Ala12 del gene sia associata con un ridotto body mass index (BMI) (<sup>154; 155; 156; 157; 158</sup>), mentre altri studi, in differenti etnie, hanno mostrato un aumentato BMI (<sup>159</sup>) o una associazione della variante Ala12 con un aumentato rischio di obesità (<sup>160;161</sup>), talvolta in maniera genere specifica (<sup>162</sup>). Gli studi che hanno valutato l'associazione tra la mutazione Pro12Ala ed il rischio di diabete tipo 2 (T2D) sono molto eterogenei a seconda della popolazione analizzata; tuttavia le meta-analisi di questi studi indicano che i portatori della variante Ala12 abbiano una riduzione media del 19% del rischio di sviluppare T2D rispetto ai portatori della variante Pro12 (<sup>163</sup>). L'associazione tra il polimorfismo Pro12Ala e il rischio di T2D sembra tuttavia estremamente complessa e probabilmente modulata da altri fattori tra cui differenti background genetici e ambientali, assunzione di lipidi con la dieta (<sup>164</sup>) e forse anche condizioni prenatali in utero (<sup>165</sup>).

Il sistema renina angiotensina è un importante regolatore della pressione sanguigna e dell'omeostasi degli elettroliti a livello renale; tuttavia gli effetti pleiotropici degli ACE inibitori, supportano un ruolo di questo sistema anche in corso di quei cambiamenti patologici nel danno d'organo attraverso una modulazione dell'espressione genica, della crescita cellulare, della fibrosi e della risposta infiammatoria.

Il gene ACE è stato oggetto di notevole attenzione negli ultimi anni come candidato nella patogenesi di numerosi condizioni tra cui il diabete (<sup>166</sup>), l'ipertensione (<sup>167</sup>), le malattie cardiovascolari (<sup>168</sup>), la nefropatia diabetica (<sup>169</sup>).

Più recentemente, numerosi componenti del sistema renina angiotensina sono stati individuati nel tessuto adiposo, e il RAS a tale livello potrebbe essere coinvolto nella regolazione della fisiologia del tessuto adiposo, e nella fisiopatologia dell'obesità e dell'ipertensione arteriosa associata all'obesità (<sup>170</sup>). Per tali ragioni il gene ACE potrebbe essere un buon candidato per la sindrome metabolica. Il più comune polimorfismo del gene ACE è il polimorfismo inserzione /delezione (I/D) situato a livello dell'introne 16; l'allele D è associato con aumentati livelli dei ACE.

#### SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare se i polimorfismi PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala e ACE I/D siano associati ai componenti della MetS in una coorte di soggetti italiani e se sia presente una interazione tra queste comuni varianti genetiche.

#### MATERIALI E METODI

##### SOGGETTI

Da Gennaio 2006 a Giugno 2009, 364 pazienti, afferenti consecutivamente presso il nostro ambulatorio per lo studio delle malattie metaboliche (dislipidemia, Sindrome metabolica, obesità e diabete) dell'Ospedale S. Anna di Ferrara, sono stati arruolati per lo studio. Tutti i soggetti erano di origine Caucasica e privi di legami di parentela.

Lo studio è stato approvato dal locale Comitato Etico e tutti partecipanti hanno fornito un consenso informato scritto per la partecipazione allo studio.

Ogni soggetto è stato sottoposto ad una valutazione clinica e ad un'intervista medica per la raccolta anamnestica; il peso e l'altezza sono stati registrati ed il BMI calcolato. La circonferenza vita è stata misurata tra l'ultima costa e la cresta iliaca al termine di una normale espirazione. Nel

corso della visita medica è stata inoltre registrata la pressione arteriosa e tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una impedenziometria per la stima della composizione corporea (Human IM plus II<sup>®</sup>, DS Medica, Milan, IT). Dopo un adeguato periodo di digiuno notturno è stato inoltre raccolto un prelievo di sangue da ogni paziente per le determinazioni biochimiche e per l'isolamento del DNA per la successiva genotipizzazione.

La sindrome metabolica è stata diagnosticata in accordo con i criteri proposti dal NCEP Adult Treatment Panel III, assegnando ad ogni individuo uno score (score Metabolico) da 0 (nessun componente della sindrome metabolica) a 5 (presenza di tutti i componenti della sindrome metabolica). I soggetti con uno score  $\geq 3$  sono stati considerate affetti dalla Sindrome metabolica.

#### ANALISI BIOCHIMICHE

La concentrazione plasmatica di glucosio è stata misurata mediante metodo della glucosio ossidasi (Glucose Analyzer II, Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA), la concentrazione di colesterolo e trigliceridi mediante tecniche enzimatiche standard (Boehringer Mannheim-Diagnostica, Mannheim, Germany); il colesterolo-LDL è stato calcolato mediante la formula di Friedewald. La concentrazione sierica del colesterolo delle HDL è stata misurata dopo precipitazione dell'apoproteina B con acido fosfotungstico -MgCl<sub>2</sub>. L'insulinemia è stata misurata con metodica standard di chemiluminescenza (Access System, Beckman, Palo Alto, CA, USA).

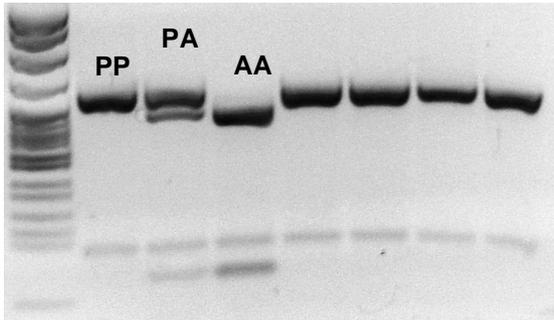
#### GENOTIPIZZAZIONE

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico mediante tecnica standard (<sup>171</sup>).

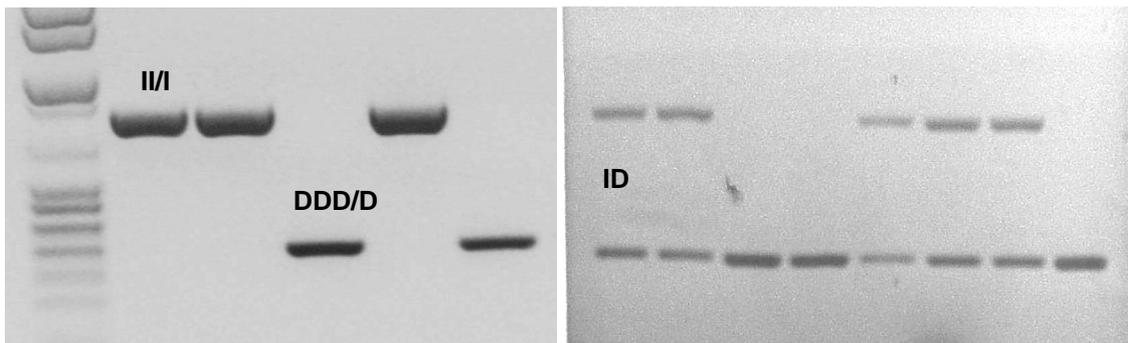
La ricerca del polimorfismo Pro12Ala PPAR $\gamma$  2 è stata effettuata mediante analisi dei polimorfismi di restrizione dopo amplificazione con PCR (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP). Questa analisi PCR-RFLP, precedentemente descritta (<sup>153</sup>), utilizza un primer mutagenico per la PCR per introdurre un sito di restrizione per BstUI solo quando è presente la sostituzione C  $\rightarrow$  G a livello del nucleotide 34 del gene del PPAR $\gamma$  2. La genotipizzazione è stata ripetuta per tutti gli omozigoti Ala12, tutti gli eterozigoti Pro12Ala e differenti omozigoti Pro12 scelti casualmente; la riproducibilità era pari al 100 %.

Un frammento di DNA dell'introne intron 16 del gene ACE è stato invece amplificato con polymerase chain reaction (PCR) per determinare il genotipo di ACE.

Le sequenze dei primers erano 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' per il primer senso e 5'-GATGTGGCCATCA CATTTCGTCAGAT-3' per il primer antisenso. Le condizioni della PCR sono state descritte precedentemente (<sup>172</sup>). Al fine evitare di genotipizzare erroneamente i soggetti ID-DD, è stata inoltre utilizzata una coppia di primers che amplificavano la regione all'interno dell'introne 16 per analizzare tutti i campioni che mostravano un genotipo DD (<sup>172</sup>).



**OMOZIGOSI DEL PPAR PER L'ALLELE PRO (PP), ALA (AA) ED ETEROZIGOSI PROALA (PA)**



**A**

**B**

**A) OMOZIGOSI PER INSERZIONE (I) E DELEZIONE (D) DEL GENE ACE; B) ETEROZIGOSI I/D.**

#### ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard se non diversamente specificato. Per quanto riguarda il polimorfismo Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2, in considerazione del numero esiguo di soggetti Ala/Ala, i soggetti Pro/Ala e gli omozigoti Ala/Ala sono stati raggruppati insieme nell'analisi statistica (chiamati XA). Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Le medie sono state comparate usando l'ANOVA. La differenza statistica della prevalenza della sindrome metabolica nei differenti genotipi è stata testata usando il test Chi-quadro. I test sono stati considerati significativi per un valore di p inferiore a 0,05.

AL fine di testare l'ipotesi che la relazione tra BMI e la circonferenza vita varia a seconda del genotipo di PPAR $\gamma$ 2, abbiamo eseguito una ANOVA a 2 vie, comparando la pendenza delle due rette di regressione. L'analisi di regressione multivariata è stata eseguita inserendo la circonferenza vita come la variabile dipendente il BMI, il sesso e il polimorfismo Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2 come variabili indipendenti.

## RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dell'intera popolazione studiata sono riportate nella tabella 1.

I portatori di un allele Ala mostrano un BMI ed una massa grassa significativamente maggiori mentre la pressione arteriosa sistolica appare significativamente minore. I soggetti con differenti polimorfismi del PPAR $\gamma$ 2 non differiscono in termini di circonferenza vita né per gli altri componenti della sindrome metabolica analizzati.

I soggetti con i diversi polimorfismi del gene ACE non mostrano differenza significative di BMI, circonferenza vita, pressione arteriosa, glicemia a digiuno, insulinemia, profilo lipidico..

Lo score Metabolico, il numero di componenti della sindrome metabolica presenti nel soggetto, in accordo con il NCEP ATPIII, non era statisticamente differente nei soggetti con i diversi polimorfismi di PPAR $\gamma$  o ACE ID (tabella 3). L'analisi dei soggetti liberi da qualsiasi trattamento farmacologico mostra una prevalenza significativamente minore della MetS nei soggetti con il genotipo ACE II (tabella 3).

Abbiamo osservato una significativa interazione tra il genotipo Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2 e il sesso del soggetto nella modulazione del BMI, della massa grassa e della pressione arteriosa sistolica (Tabella 2). Infatti, quando si analizzano maschi e femmine separatamente, i soggetti di sesso femminile mostrano un aumentato BMI ( $p=0,029$ ) e massa grassa ( $p=0,028$ ). Lo stesso trend si osserva per la pressione arteriosa che non differisce significativamente negli uomini portatori dell'allele Ala ma che risulta inferiore nelle donne portatrici dell'allele Ala, anche se il dato non può essere considerato statisticamente significativo ( $p=0,07$ ).

Abbiamo identificato un genotipo PPAR $\gamma$ -ACE di rischio *per il BMI e la massa grassa* mediante ANCOVA, includendo tutte le possibili combinazioni di genotipo (Figure 1). I soggetti omozigoti per l'allele D del gene ACE e portatori di un allele Ala del PPAR $\gamma$  (XA/DD) mostrano un BMI ( $p=0,05$ ) e una massa grassa ( $p=0,054$ ) significativamente aumentati rispetto ai soggetti PPAR $\gamma$ 2 PP/ACE II.

Allo scopo di valutare il possibile effetto della presenza dell'allele Ala sulla distribuzione del tessuto adiposo, abbiamo plottato su un grafico i valori di BMI contro la circonferenza vita (figure 2) nei diversi genotipo di PPAR $\gamma$ : come atteso, il BMI correla significativamente con la circonferenza vita in entrambi i genotipi di PPAR $\gamma$  (X/A e P/P), tuttavia la pendenza della regressione lineare tende ad essere inferiore negli individui portatori di un allele Ala. L'analisi di

regressione multipla riportata nella tabella 4 mostra che il polimorfismo PPAR $\gamma$ 2 Pro 12 Ala predice la circonferenza vita indipendentemente ( $\beta$  - 2,74,  $p= 0,04$ ) dagli altri noti predittori come il BMI ed il sesso.

TABELLA 1 CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA POPOLAZIONE NEI DIFFERENTI GENOTIPI PPAR $\gamma$ 2 E ACE I/D

	Tutti i soggetti						
	Pro12Ala			ACE I/D			
	PP (334)	XA (30)	p	DD (137)	ID (172)	II (55)	p
Età (aa)	56±13	53±10	0,200	56±12	55±14	56±13	0,805
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>30,6±5,7</b>	<b>33,2±6,3</b>	<b>0,015</b>	31,3±6,3	30,4±5,4	30,9±5,5	0,402
Vita (cm)	98,4±13,9	100,1±13,8	0,528	99,8±14,5	97,5±13,2	98,7±14,2	0,360
<b>Massa Grassa (kg)</b>	<b>30,1±11,9</b>	<b>35,7±13,1</b>	<b>0,016</b>	31,1±12,8	29,9±11,6	31,1±12,2	0,644
Glucosio (mg/dl)	116,5±46,7	106,8±41,2	0,271	120,7±52,3	111,5±41,6	116,5±44,3	0,217
Insulina ( $\mu$ UI/L)	9,8±7,8	11,4±5,9	0,284	9,3±5,4	10,2±8,9	11,0±8,5	0,338
HOMA Insulin Resistance	2,8±2,7	2,9±2,3	0,668	2,7±2,1	2,8±3,1	3,0±2,5	0,816
<b>Pressione Sistolica (mmHg)</b>	<b>134,1±17,4</b>	<b>126,8±17,2</b>	<b>0,033</b>	132,3±17,1	134,7±18,1	132,6±16,3	0,486
Pressione diastolica (mmHg)	82,4±8,5	81,6±10,6	0,637	82,4±9,2	82,6±8,3	81,2±8,5	0,612
Colesterolo (mg/dl)	217,6±53,2	229,2±42,8	0,245	223,3±54,2	218,9±52,9	205,4±44,7	0,099
Trigliceridi (mg/dl)	148,7±88,7	139,1±84,2	0,566	154,9±92,6	146,2±91,4	136,6±63,9	0,410
HDL-Colesterolo (mg/dl)	51,9±14,2	53,4±12,9	0,595	51,8±14,3	52,1±14,4	52,7±12,6	0,916
LDL-Colesterolo (mg/dl)	135,9±49,1	148,0±41,9	0,199	139,9±46,5	138,2±51,5	125,4±44,0	0,155

TABELLA 2 DIMORFISMO DEL COMPORTAMENTO DEL POLIMORFISMO PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala IN BASE AL SESSO DEL SOGGETTO

	PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala					
	Maschi			Femmine		
	PP (129)	XA (8)	p	PP (205)	XA (22)	p
Età (aa)	57±14	57±14	,970	55±13	51±8	0,141
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29,98±4,75	31,20±6,69	,492	<b>30,98±6,19</b>	<b>34,02±6,16</b>	<b>0,029</b>
Vita (cm)	102,40±12,76	104,19±15,04	,705	95,92±14,05	98,61±13,38	0,392
<b>Massa Grassa (kg)</b>	27,35±10,62	29,16±13,56	,646	<b>31,88±12,47</b>	<b>38,08±12,42</b>	<b>0,028</b>
Glucosio (mg/dl)	127,07±50,85	107,13±38,17	,278	109,89±42,80	106,66±43,16	0,737
Insulina ( $\mu$ UI/L)	9,53±6,82	8,83±5,55	,778	10,04±8,39	12,35±5,88	0,210
HOMA Insulin Resistance	2,87±2,20	2,29±1,50	,466	2,71±2,96	3,24±2,50	0,416
<b>Pressione Sistolica (mmHg)</b>	136,93±15,09	134,17±6,65	,657	<b>132,38±18,51</b>	<b>124,77±18,67</b>	<b>0,070</b>
Pressione diastolica (mmHg)	82,57±8,23	84,17±7,36	,642	82,33±8,69	80,91±11,41	0,485
Colesterolo (mg/dl)	211,49±59,68	213,13±38,80	,939	221,44±48,40	235,10±43,56	0,206
Trigliceridi (mg/dl)	177,44±109,89	145,00±82,61	,414	130,74±66,48	136,94±86,66	0,687
HDL-Colesterolo (mg/dl)	45,59±13,08	52,38±11,72	,155	55,94±13,35	53,73±13,56	0,463
LDL-Colesterolo (mg/dl)	129,72±54,56	131,75±34,88	,918	139,70±45,29	154,21±43,53	0,162

TABELLA 3. NUMERO DEI COMPONENTI DELLA SINDROME METABOLICA (METABOLIC SCORE) E PREVALENZA DELLA SINDROME METABOLICA TRA I DIFFERENTI GENOTIPI DI PPAR $\gamma$  AND ACE.

		Tutti i soggetti						
		Pro12Ala			ACE I/D			
		PP (334)	XA (30)	p	DD (137)	ID (172)	II (55)	p
<b>Tutti</b> <b>(n 364)</b>	<b>Metabolic score (n)</b>	2,6 $\pm$ 1,2	2,4 $\pm$ 1,2	0,53 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 1,3	2,5 $\pm$ 1,2	2,4 $\pm$ 1,1	0,23 <sup>a</sup>
	<b>Sindrome Metabolica (%)</b>	53,3	53,4	0,57 <sup>b</sup>	58,7	51,5	45,5	0,20 <sup>b</sup>
		PP (143)	XA (18)		DD (55)	ID (84)	II (22)	
<b>Non trattati</b> <b>(n 161)</b>	<b>Metabolic score (n)</b>	2,01 $\pm$ 1,2	2,11 $\pm$ 1,1	0,74	2,11 $\pm$ 1,2	2,10 $\pm$ 1,2	1,55 $\pm$ 1	0,09
	<b>Sindrome Metabolica (%)</b>	33,6	38,9	0,42	<b>42,9</b>	<b>34,9</b>	<b>9,1</b>	<b>0,018<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup> Univariate ANOVA, <sup>b</sup> Chi-square analysis

TABELLA 4. ANALISI DI REGRESSIONE MULTIVARIATA DELLA RELAZIONE TRA CIRCONFERENZA VITA E LE ALTER VARIABILI DI INTERESSE \*.

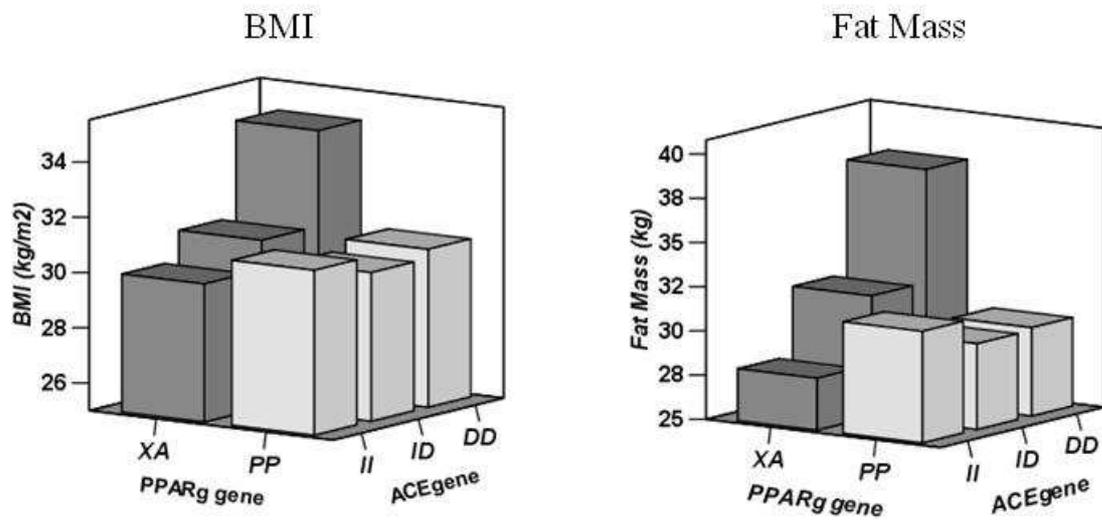
	$\beta$ coefficient	p
<b>BMI</b>	<b>2,037</b>	<b>0,0001</b>
<b>Sesso</b>	<b>8,752</b>	<b>0,0001</b>
<b>PPAR<math>\gamma</math> Pro12Ala</b>	<b>-2,737</b>	<b>0,04</b>

\*Il Genotipo di PPAR $\gamma$  è stato inserito come una variabile categorica (PP= 0 and XA = 1). Il sesso è stato inserito come una variabile categorica (F=0 and Male =1).

p=0,0001 per l'intero modello; R<sup>2</sup>=0,748

FIGURA 1. ANALISI DELL'INTERAZIONE TRA IL POLIMORFISMO PPAR $\gamma$ 2 PRO12ALA E ACE I/D SUL BMI E SULLA MASSA GRASSA.

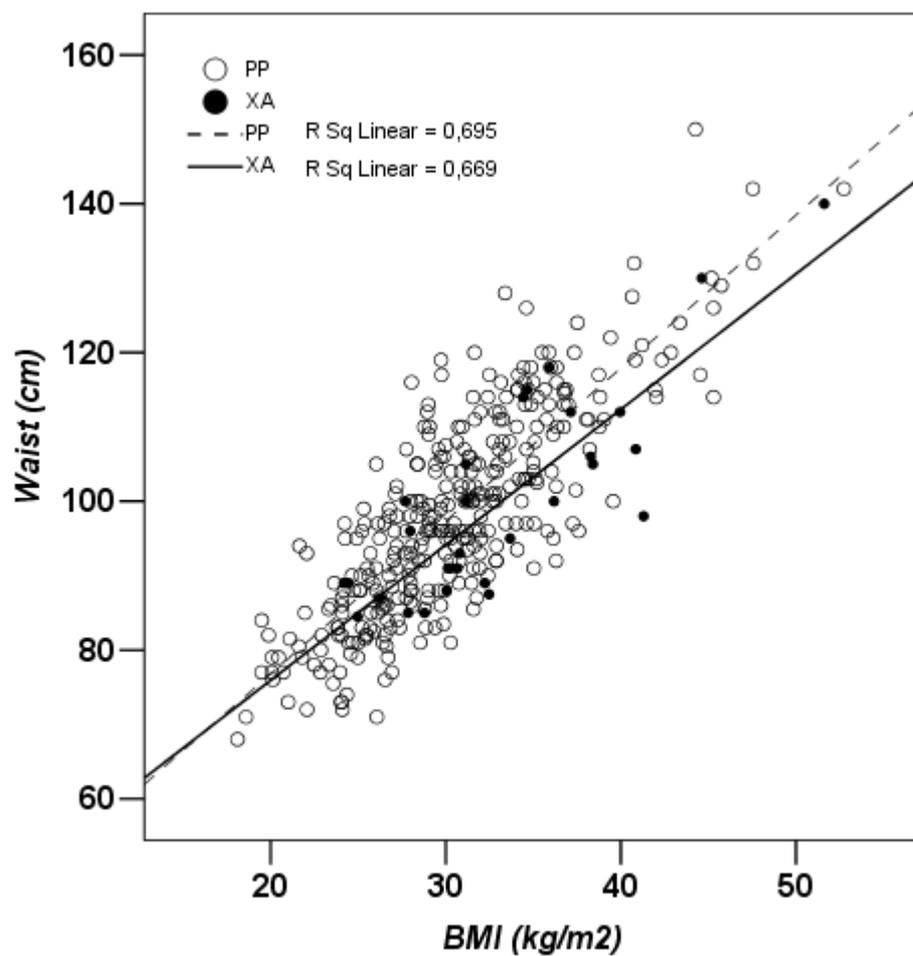
Il BMI (grafico di sinistra) e la Massa Grassa (grafico a destra) sono stati plottati in tutte e 6 le combinazioni di genotipo possibili. Nel pannello in basso sono riportate le medie  $\pm$ SD e il valore della p per l'ANOVA.



Genotypes

	PP/DD	PP/ID	PP/II	XA/DD	XA/ID	XA/II	p
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,7 $\pm$ 6,0	30,4 $\pm$ 5,4	31,0 $\pm$ 5,6	34,5 $\pm$ 6,8	31,1 $\pm$ 5,6	30,0 $\pm$ 1,2	0,05
<b>FatMass (Kg)</b>	30,0 $\pm$ 12,2	29,8 $\pm$ 11,7	31,3 $\pm$ 12,5	38,2 $\pm$ 14,2	31,8 $\pm$ 10,9	27,9 $\pm$ 3,0	0,054

FIGURA 2. CORRELAZIONE LINEARE TRA BMI E CIRCONFERENZA VITA NEI DIFFERENTI GENOTIPI  
PPAR $\gamma$ 2 PRO12 ALA



## DISCUSSIONE

La sindrome metabolica può essere considerata il risultato dall'interazione di un substrato genetico predisponente con specifici fattori ambientali come la dieta e lo stile di vita sedentario.

In considerazione del ruolo centrale del tessuto adiposo, geni coinvolti nel metabolismo dell'adipocita come PPAR $\gamma$  e ACE appaiono buoni candidati nello sviluppo della sindrome metabolica.

Come già riportato in precedenti studi (<sup>159;160;161</sup>) abbiamo osservato un BMI significativamente maggiore nei soggetti portatori di un allele Ala per il polimorfismo Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2. Nella nostra popolazione abbiamo trovato una interazione significativa tra sesso e polimorfismo Pro12Ala nella modulazione del BMI: l'analisi separate dei soggetti maschi e femmine mostra infatti che l'associazione è statisticamente significativa nelle sole donne, in contrasto con quanto riportato recentemente da Morini et al. (<sup>162</sup>) in una popolazione con lo stesso background genetico. Non possiamo escludere che la mancanza di associazione osservata nei maschi possa essere dovuta al limitato numero di maschi arruolati e di conseguenza alla mancanza di potere statistico per cogliere la minor differenza del BMI osservata negli uomini portatori dell'allele Ala.

Nonostante i portatori dell'allele Ala presentino un BMI significativamente maggiore, questi soggetti hanno una circonferenza vita, una glicemia a digiuno e valori di insulinemia comparabili con i soggetti omozigoti per l'allele P. In aggiunta gli individui XA mostrano valori di pressione arteriosa sistolica significativamente minori rispetto ai soggetti PP. Dai nostri dati sembra emergere che l'aumento del BMI associato alla presenza del genotipo PPAR $\gamma$ 2 Ala/X non sia associato ad un peggiore profilo metabolico. Sembra plausibile che il genotipo PPAR $\gamma$ 2 Ala/X possa conferire una certa protezione nella distribuzione centrale del tessuto adiposo, proteggendo in tal modo l'individuo dalle conseguenze metaboliche derivanti dall'aumento del BMI.

A supporto di questa ipotesi abbiamo osservato che la retta di regressione tra BMI e circonferenza vita ha una pendenza minore nei portatori dell'allele Ala; sebbene tale differenza non raggiunga la significatività statistica, questo dato suggerisce che per ogni determinato BMI, i soggetti portatori dell'allele Ala potrebbero presentare una minore quantità di tessuto adiposo viscerale. A sostegno

di questa ipotesi l'analisi di regressione multipla dimostra che il polimorfismo PPAR $\gamma$ 2 Pro12 Ala è un predittore della circonferenza vita, indipendente dal sesso e dal BMI: la presenza del genotipo XA predice una circonferenza vita inferiore di circa 3 cm rispetto ai soggetti non portatori del polimorfismo con BMI sovrapponibile e dello stesso sesso.

Numerosi studi sull'uomo e sull'animale dimostrano un ruolo centrale di PPAR $\gamma$  sulla distribuzione del tessuto adiposo e soggetti portatori di mutazioni di PPAR $\gamma$  mostrano un'alterata distribuzione del tessuto adiposo e quadri di lipodistrofia parziale (<sup>173</sup>; <sup>174</sup>). Il genotipo PPAR $\gamma$  Ala è generalmente considerato conferire una minore attività trascrizionale a PPAR $\gamma$ . Tale ridotta attività è stata considerata l'elemento cardine alla base della riduzione del BMI e della conseguente aumentata sensibilità insulinica dei soggetti con un allele Ala, riportati in altri studi (<sup>156</sup>). Tuttavia, studi su modelli animali con mutazioni del PPAR $\gamma$  e sull'uomo hanno evidenziato che la relazione tra attività di PPAR $\gamma$  e sensibilità insulinica non è lineare e non passa necessariamente attraverso modificazioni della massa grassa. Gli individui portatori di una rara mutazione del PPAR $\gamma$  (P467L) mostrano un quadro di lipodistrofia e sono insulino resistenti (<sup>174</sup>). Modificazioni qualitative e una alterata distribuzione del tessuto adiposo sono elementi fondamentali nel determinare le anomalie metaboliche presenti in questi soggetti. In questa ottica noi supportiamo l'idea che l'aumento del BMI osservato nei soggetti portatori dell'allele Ala possa non essere negativo, similmente a quanto accade nei pazienti trattati con tiazolidinedioni che mostrano un miglioramento del profilo metabolico nonostante un aumento del peso corporeo. Analogamente i soggetti portatori dell'allele Ala hanno un BMI più elevato ma livelli minori di pressione arteriosa sistolica e un profilo lipidico comparabile rispetto ai soggetti portatori del genotipo PP.

Per quanto riguarda il polimorfismo ACE ID, non abbiamo evidenziato alcuna differenza tra i soggetti con i differenti polimorfismi nei parametri analizzati. Gli studi pubblicati fino ad ora riportano sia una associazione con la sindrome metabolica o con l'ipertensione sia una mancanza di associazione (<sup>140</sup>; <sup>175</sup>). Tale variabilità potrebbe dipendere dal substrato genetico, dalla popolazione presa in esame (soggetti diabetici o non diabetici) ma anche dall'utilizzo di differenti criteri diagnostici per la definizione di sindrome metabolica. I criteri proposti dal NCEP ATP III sono semplici da utilizzare dal punto di vista operativo, tuttavia i soggetti possono essere classificati ipertesi o diabetici sulla sola base dell'utilizzo di farmaci antidiabetici o antiipertensivi, inclusi gli ACE inibitori. Questo potrebbe avere un effetto confondente quando si analizza l'effetto del polimorfismo dell'ACE gene. L'analisi dei soli soggetti liberi da terapie farmacologiche mostra che

la prevalenza della sindrome metabolica è significativamente minore nei soggetti con genotipo ACE II rispetto ai soggetti con il genotipo ACE DD.

Abbiamo trovato una interazione significativa tra il polimorfismo ACE I/D e PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala sulla modulazione del BMI e della massa grassa: i soggetti PPAR $\gamma$  XA/ACE DD mostrano infatti i più elevati valori di BMI e massa grassa. Tale dato non è completamente inatteso. Infatti, recenti studi dimostrano un ruolo del gene ACE nella modulazione del peso corporeo: un modello murino knock out per l'ACE gene mostra una riduzione della massa grassa e una aumentata sensibilità insulinica (<sup>176</sup>). Inoltre, Eisenmann et al. ha recentemente riportato che i bambini portatori del genotipo ACE DD mostrano un BMI più elevato rispetto ai portatori del genotipo ACE II (<sup>37</sup>). Da un punto di vista fisiopatologico i portatori del genotipo ACE DD hanno livelli più elevate di ACE e di conseguenza livelli potenzialmente più elevate di Angiotensina II che è stato identificato come un fattore coinvolto nella differenziazione dei preadipociti a adipociti maturi (<sup>38; 177</sup>).

In conclusione i nostri dati mostrano che nonostante non vi sia una associazione tra il polimorfismo PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala and ACE I/D e la sindrome metabolica, i soggetti portatori del genotipo PPAR $\gamma$ 2 Ala mostrano un BMI più elevato e una maggiore massa grassa in assenza tuttavia di un peggior profilo metabolico, probabilmente grazie a una più favorevole distribuzione del tessuto adiposo. La presenza dell'allele Ala sembra infatti associarsi ad un minore accumulo di tessuto adiposo a livello viscerale. Tale effetto del polimorfismo Pro12Ala sul BMI non sembra costante nei due sessi e l'associazione appare più debole nell'uomo sia per il BMI che per la massa grassa. Abbiamo evidenziato una possibile interazione tra questi due comuni polimorfismi del gene ACE e PPAR $\gamma$ 2 sulla modulazione del BMI e della massa grassa. Saranno necessari ulteriori studi per chiarire il reale contributo del polimorfismo nella determinazione della distribuzione del tessuto adiposo.



## BIBLIOGRAFIA



- 1 World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: the Organization 2000. Technical report series n°894.
- 2 Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US Adults, 1999-2000. JAMA 2002; 1723-1727.
- 3 Clinical Guidelines on Identification, Eventual, and Treatment Overweight and Obesity in Adult- The evidence report. National Institutes of Health. *Obes Res.* 1998;Suppl 2:51S-209S
- 4 Kannel WB, Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension, *J Hum Hypertens* 2000; 14: 83-90
- 5 Denke MA, Sempos CT, Grundy SM, Excess body weight: an underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men, *Arch Intern Med* 1993; 153: 1093-1103
- 6 Ashley FW Jr, Kannel WB, Relation of weight change to changes in atherogenic traits: the Framingham Study, *J Chronic Dis* 1974; 27: 103-114
- 7 Garrison RJ, Wilson PW, Castelli WP, et al, Obesity and lipoprotein cholesterol in the Framingham offspring study, *Metabolism* 1980; 29:1053-1060
- 8 Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al, Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men, *Am J Epidemiol* 1995; 141: 1117-1127
- 9 Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, et al, A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women, *JAMA* 1997; 277: 1539-1545
- 10 Percik R, Stumvoll M. Obesity and cancer. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009 Nov;117(10):563-6.
- 11 Guilleminault C, Quera-Salva MA, Partinen M, et al, Women and the obstructive sleep apnea syndrom, *Chest* 1988; 93: 104-109
- 12 Sturmer T, Gunther KP, Brenner H, Obesity, Overweight and patterns of osteoarthritis: the Um Osteoarthritis Study, *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 307-313
- 13 Cicuttini FM, Baker JR, Spector TD, The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study, *J Reumatol* 1996; 23: 1221-1226
- 14 Garn SM, Clark DC. Trends in fatness and the origins of obesity Ad Hoc Committee to Review the Ten-State Nutrition Survey. *Pediatrics.* 1976 Apr;57(4):443-56.
- 15 Stuebe AM, Forman MR, Michels KB. Maternal-recalled gestational weight gain, pre-pregnancy body mass index, and obesity in the daughter. *Int J Obes (Lond).* 2009 Jul;33(7):743-52.
- 16 Sellers TA, Drinkard C, Rich SS, Potter JD, Jeffery RW, Hong CP, Folsom AR. Familial aggregation and heritability of waist-to-hip ratio in adult women: the Iowa Women's Health Study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1994 Sep;18(9):607-13.
- 17 Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity. *JAMA.* 1986 Jul 4;256(1):51-4.

- 18 Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996 Jun;20(6):501-6.
- 19 Stunkard AJ, Sorensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med*. 1986 Jan 23;314(4):193-8.
- 20 Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Apr;14(4):529-644.
- 21 Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:409-24. Review.
- 22 Mutch, D.M. & Clement, K. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet*. 2, e188 (2006).
- 23 Chung WK, Leibel RL. Molecular physiology of syndromic obesities in humans. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Aug;16(6):267-72. Review.
- 24 Kousta E, Hadjiathanasiou CG, Tolis G, Papathanasiou A. Pleiotropic genetic syndromes with developmental abnormalities associated with obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009 Jul;22(7):581-92.
- 25 Korner J, Leibel RL. To eat or not to eat - how the gut talks to the brain. *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):926-8.
- 26 Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):13-23. Review.
- 27 Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):903-8.
- 28 Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(8):1093-103.
- 29 Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*. 1998 Mar;18(3):213-5.
- 30 Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998 Mar 26;392(6674):398-401.
- 31 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 ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Oct;88(10):4633-40.

- 32 Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1085-95.
- 33 Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 1997 Jul;16(3):303-6.
- 34 Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ, Holst JJ, Brubaker PL, Corvol P, Polonsky KS, Ostrega D, Becker KL, Bertagna X, Hutton JC, White A, Dattani MT, Hussain K, Middleton SJ, Nicole TM, Milla PJ, Lindley KJ, O'Rahilly S. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(10):1550-60.
- 35 Frayling, T.M. et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889–894 (2007).
- 36 Scuteri A, Sanna S, Chen W-M, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orru M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007; 3: e115.
- 37 Loos, R.J. et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* 40, 768–775 (2008).
- 38 Chambers, J.C. et al. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat. Genet.* 40, 716–718 (2008).
- 39 Loos RJ, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes Rev.* 2008 May;9(3):246-50. Review.
- 40 Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Gretarsdóttir S, Thorlacius S, Jonsdóttir I, Jonsdóttir T, Olafsdóttir EJ, Olafsdóttir GH, Jonsson T, Jonsson F, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Lauritzen T, Aben KK, Verbeek AL, Roeleveld N, Kampman E, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadóttir L, Rafnar T, Becker DM, Gulcher J, Kiemeneý LA, Pedersen O, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 2009 Jan;41(1):18-24.
- 41 Poitou C, Lacorte JM, Coupaye M, Bertrais S, Bedel JF, Lafon N, Bouillot JL, Galan P, Borson-Chazot F, Basdevant A, Coussieu C, Clement K. Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obes Surg.* 2005 Jan;15(1):11-23.
- 42 Carroll L, Voisey J, van Daal A. Gene polymorphisms and their effects in the melanocortin system. *Peptides.* 2005 Oct;26(10):1871-85. Review.
- 43 Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S, Mitchell BD, Mahaney MC, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG. Normal variation in leptin levels is associated with polymorphisms in the proopiomelanocortin gene, POMC. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Sep;84(9):3187-91.

- 44 Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, Wareham NJ, Yeo GS, Bhattacharyya S, Froguel P, White A, Farooqi IS, O'Rahilly S. 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 Aug 15;11(17):1997-2004.
- 45 Lee YS, Challis BG, Thompson DA, Yeo GS, Keogh JM, Madonna ME, Wraight V, Sims M, Vatin V, Meyre D, Shield J, Burren C, Ibrahim Z, Cheetham T, Swift P, Blackwood A, Hung CC, Wareham NJ, Froguel P, Millhauser GL, O'Rahilly S, Farooqi IS. A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab.* 2006 Feb;3(2):135-40.
- 46 Avogaro P, Crepaldi G, Enzi G. Association of hyperlipemia, diabetes mellitus and mild obesity. *Acta Diabetol Lat* 1967;4:572-90.
- 47 Haller H. Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia. *Z Gesamte Inn Med* 1977;32:124-8.
- 48 Reaven GM. Role of insulin-resistance in human disease. Banting lecture 1988. *Diabetes* 1988;37:1595-607
- 49 Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989;149:1514-20.
- 50 De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulino-resistenza. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-94.
- 51 Groop L, Orho-Melander M. The dysmetabolic syndrome. *J Intern Med* 2001;250:105-20.
- 52 Erkelens DW, de Bruin TWA, Cabezas MC. Tulp syndrome. *Lancet* 1993;18:1536-7.
- 53 Morgagni GB. The seats and causes of diseases investigated by anatomy De sedibus et causis morborum per anatomen indagata. Vol. 1. Padova: Remondini 1775 (MDCCLXXV).
- 54 Kylin E. Studien ueber das hypertonie-hyperglykamie-hyperurikamiesyndrom. *Zentralblatt Fuer Innere* 1923;44:105-27.
- 55 Vague J. La differentiation sexuelle. Facteur determinant des formes de l'obesité. *Presse Med* 1947;30:339-40.
- 56 Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutrition* 1956;4:20-7.
- 57 Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* 1991;34:416-22.
- 58 Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998,15:539-53.

- 59 Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
- 60 Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care* 2003;26:575-81.
- 61 Olefsky JM. Insensitivity of large rat adipocytes to the antilipolytic effects of insulin. *J Lipid Res.* 1977 Jul;18(4):459-64
- 62 Berger JJ, Barnard RJ. Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J Appl Physiol.* 1999 Jul;87(1):227-32
- 63 Reaven GM. 1988 Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-607
- 64 Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM; Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes.* 2003 May;52(5):1210-4
- 65 Trevisan M, Liu J, Bahsas FB, Menotti A. Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. *Am J Epidemiol.* 1998 Nov 15;148(10):958-66.
- 66 Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med.* 1999 Mar;16(3):179-92. Review.
- 67 Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12953-6.
- 68 Gray SL, Dalla Nora E, Vidal-Puig AJ. Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homeostasis. *Biochem Soc Trans.* 2005 Nov;33(Pt 5):1053-8. Review
- 69 Reitman ML. Metabolic lessons from genetically lean mice. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:459-82. Epub 2002 Jan 04. Review.
- 70 Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 1998 Oct 15;12(20):3168-81
- 71 Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* 1998 Oct 15;12(20):3182-94.
- 72 Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8456-60.
- 73 Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipodystrophic mice. *J Clin Invest.* 2000 Feb;105(3):271-8.

- 74 Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*. 1999 Sep 2;401(6748):73-6.
- 75 Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD, Dixon AK, Dunne F, Boiani R, Cinti S, Vidal-Puig A, Karpe F, Chatterjee VK, O'Rahilly S Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):910-7.
- 76 Molina JM, Ciaraldi TP, Brady D, Olefsky JM. Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes*. 1989 Aug;38(8):991-5.
- 77 Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:365-93. Review
- 78 Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002 Mar-Apr;18 Suppl 2:S10-5. Review
- 79 Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996 Oct 1;15(19):5336-48.
- 80 Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16710-4.
- 81 Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19269-76.
- 82 Bakopanos E, Silva JE. Thiazolidinediones inhibit the expression of beta3-adrenergic receptors at a transcriptional level. *Diabetes*. 2000 Dec;49(12):2108-15.
- 83 Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5793-6.
- 84 Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):18785-90.
- 85 Glorian M, Duplus E, Beale EG, Scott DK, Granner DK, Forest C. A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie*. 2001 Oct;83(10):933-43.
- 86 Hsueh WA, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2003 Aug 18;92(4A):3J-9J. Review.
- 87 Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med*. 2000 Apr;247(4):425-31. Review.

- 88 Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM, Savage PJ, Rewers M. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and carotid wall thickness: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*. 1998 Nov;21(11):1812-8.
- 89 Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*. 2003 Apr;20(4):255-68. Review.
- 90 Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Dec;27 Suppl 3:S25-8. Review.
- 91 Singhal A, Farooqi IS, Cole TJ, O'Rahilly S, Fewtrell M, Kattenhorn M, Lucas A, Deanfield J. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1919-24.
- 92 Nishina PM, Naggert JK, Verstuyft J, Paigen B. Atherosclerosis in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. *Metabolism*. 1994 May;43(5):554-8.
- 93 Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 1997 Feb 1;79(3):350-4.
- 94 Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*. 2000 Jul;49(7):1231-8
- 95 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32. b
- 96 Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Nov;26(11):1407-33. Review.
- 97 Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*. 2000 Jul;141(7):2328-39.
- 98 Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002 Jan 17;415(6869):339-43.
- 99 Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, Reitman ML. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. *Diabetes*. 2002 Sep;51(9):2727-33.
- 100 Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res*. 2000 Jul;8(4):337-41.
- 101 Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*, 2001, 15, 2727-9.
- 102 Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology*, 2001, 142, 487-92.
- 103 Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Jun;26(6):754-64. Review.

- 104 Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*. 1999 Dec 23-30;402(6764):880-3.
- 105 Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):408-11.
- 106 Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3586-90.
- 107 Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD, Dixon AK, Dunne F, Boiani R, Cinti S, Vidal-Puig A, Karpe F, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):910-7.
- 108 Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI. Lipodystrophy revisited. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Dec;11(10):410-6. Review.
- 109 Savage DB, Agostini M, Barroso I, Gurnell M, Luan J, Meirhaeghe A, Harding AH, Ihrke G, Rajanayagam O, Soos MA, George S, Berger D, Thomas EL, Bell JD, Meeran K, Ross RJ, Vidal-Puig A, Wareham NJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Schafer AJ. Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):379-84. Epub 2002 Jul 15. Erratum in: *Nat Genet* 2002 Sep;32(1):211.
- 110 Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med*. 1998 Oct 1;339:953-9
- 111 Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999 Oct;20(5):649-88.
- 112 Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000 Sep;26(1):76-80.
- 113 Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2341-7.
- 114 Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):27-32.
- 115 Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998 Nov;20(3):284-7.
- 116 Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T. The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 29;271(1):212-6.

- 117 Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellese AA, Riccardi G, Colantuoni V. Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999 Jul;48(7):1466-8.
- 118 Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P. Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Feb;24:195-9.
- 119 Cole SA, Mitchell BD, Hsueh WC, Pineda P, Beamer BA, Shuldiner AR, Comuzzie AG, Blangero J, Hixson JE. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Apr;24(4):522-4.
- 120 Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes*. 1998 Nov;47(11):1806-8.
- 121 Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes*. 2001 Mar;50(3):686-9.
- 122 He W. PPARgamma2 Polymorphism and Human Health. *PPAR Res*. 2009;2009:849538.
- 123 Yamazaki T, Yazaki Y. Role of tissue angiotensin II in myocardial remodelling induced by mechanical stress. *J Hum Hypertens*. 1999 Jan;13 Suppl 1:S43-7; discussion S49-50. Review.
- 124 Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ. Res* 1988a;62:1259-1262.
- 125 Saye JA, Cassis LA, Sturgill TW, Lynch KR, Peach MJ. Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am. J. Physiol* 1989;256:C448-C451.
- 126 Saye JA, Ragsdale NV, Carey RM, Peach MJ. Localization of angiotensin peptide-forming enzymes of 3T3-F442A adipocytes. *Am. J. Physiol* 1993;264:C1570-C1576.
- 127 Cassis LA. Fat cell metabolism: insulin, fatty acids, and renin. *Curr. Hypertens. Rep* 2000;2:132-138.
- 128 Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2007;292:R274-R282.
- 129 Galvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, de Las Heras AI, Merino B, Arribas S, Ruiz-Gayo M, Huber M, Wehland M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J. Endocrinol* 2008;197:55-64.
- 130 Darimont C, Vassaux G, Ailhaud G, Negrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology*. 1994 Nov;135(5):2030-6. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):E867-76.
- 131 Thatcher S, Yiannikouris F, Gupte M, Cassis L. The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Apr 29;302(2):111-7. Review.

- 132 Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*. 1999 Feb 20;353(9153):611-6.
- 133 Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, et al. ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens*. 1997 Feb;11(2):107-11.
- 134 Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, et al. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem*. 1995 Feb 3;270(5):2367-71
- 135 Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990 Oct;86(4):1343-6.
- 136 Strazzullo P, Iacone R, Iacoviello L, Russo O, Barba G, Russo P, D'Orazio A, Barbato A, Cappuccio FP, Farinaro E, Siani A; Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men: the Olivetti Prospective Heart Study. *Ann Intern Med*. 2003 Jan 7;138(1):17-23.
- 137 Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Sanderson JE, Cockram CS, Critchley JA. Renin-angiotensin system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Feb;24(2):356-61
- 138 Tascilar N, Dursun A, Ankarali H, Mungan G, Ekem S, Baris S. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism has no effect on the risk of atherosclerotic stroke or hypertension. *J Neurol Sci*. 2009 Oct 15;285(1-2):137-41.
- 139 Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 1992 Oct 15;359(6396):588-9.
- 140 Lee YJ, Tsai JC. ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with 1998 World Health Organization definition of metabolic syndrome in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002 Jun;25(6):1002-8.
- 141 Riera-Fortuny C, Real JT, Chaves FJ, Morales-Suarez-Varela M, Martinez-Triguero ML, Morillas-Arino C, Hernandez-Mijares A. The relation between obesity, abdominal fat deposit and the angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and its association with coronary heart disease. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Jan;29(1):78-84.
- 142 Perticone F, Ceravolo R, Iacopino S, Cloro C, Ventura G, Maio R, Gulletta E, Perrotti N, Mattioli PL. Relationship between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and insulin resistance in never-treated hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jan;86(1):172-8.
- 143 Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM, Ferrell RE. The insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is related to insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care*. 2001 Sep;24(9):1646-52.

- 144 Paolisso G, Tagliamonte MR, De Lucia D, Palmieri F, Manzella D, Rinaldi C, Bossone A, Colaizzo D, Margaglione M, Varricchio M. ACE gene polymorphism and insulin action in older subjects and healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc.* 2001 May;49(5):610-4.
- 145 Ide T, Egan K, Bell-Parikh LC, FitzGerald GA. Activation of nuclear receptors by prostaglandins. *Thromb Res.* 2003 Jun 15;110:311-5.
- 146 Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest.* 2003 Sep;112:945-55.
- 147 Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272:18779-89.
- 148 Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996 Jan;137:354-66.
- 149 Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:535-59.
- 150 Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol.* 1992 Feb;41:393-8.
- 151 Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106:467-72.
- 152 Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270:12953-6.
- 153 Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Dec 18;241:270-4.
- 154 Bouhaha R, Meyre D, Kamoun HA, Ennaffaa H, Vaillant E, Sassi R, Baroudi T, Vatin V, Froguel P, et al. Effect of ENPP1/PC-1-K121Q and PPARgamma-Pro12Ala polymorphisms on the genetic susceptibility to T2D in the Tunisian population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Sep;81:278-83.
- 155 Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism.* 2004 Mar;53:303-9.
- 156 Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 1998 Nov;20:284-7.
- 157 Doney A, Fischer B, Frew D, Cumming A, Flavell DM, World M, Montgomery HE, Boyle D, Morris A, Palmer CN. Haplotype analysis of the PPARgamma Pro12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight. *BMC Genet.* 2002 Nov 13;3:21.

- 158 Rosado EL, Bressan J, Martins MF, Cecon PR, Martinez JA. Polymorphism in the PPARgamma2 and beta2-adrenergic genes and diet lipid effects on body composition, energy expenditure and eating behavior of obese women. *Appetite*. 2007 Nov;49:635-43.
- 159 Fornage M, Jacobs DR, Steffes MW, Gross MD, Bray MS, Schreiner PJ. Inverse effects of the PPAR(gamma)2 Pro12Ala polymorphism on measures of adiposity over 15 years in African Americans and whites. The CARDIA study. *Metabolism*. 2005 Jul;54:910-7.
- 160 Cole SA, Mitchell BD, Hsueh WC, Pineda P, Beamer BA, Shuldiner AR, Comuzzie AG, Blangero J, Hixson JE. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Apr;24:522-4.
- 161 Ochoa MC, Marti A, Azcona C, Chueca M, Oyarzabal M, Pelach R, Patino A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Gene-gene interaction between PPAR gamma 2 and ADR beta 3 increases obesity risk in children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Nov;28 Suppl 3:S37-S41.
- 162 Morini E, Tassi V, Capponi D, Ludovico O, Dallapiccola B, Trischitta V, Prudente S. Interaction between PPARgamma2 variants and gender on the modulation of body weight. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jun;16:1467-70.
- 163 Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000 Sep;26:76-80.
- 164 Scacchi R, Pinto A, Rickards O, Pacella A, De Stefano GF, Cannella C, Corbo RM. An analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma 2) Pro12Ala polymorphism distribution and prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in world populations in relation to dietary habits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 Nov;17:632-41.
- 165 de Rooij SR, Painter RC, Phillips DI, Osmond C, Tanck MW, Defesche JC, Bossuyt PM, Michels RP, Bleker OP, Roseboom TJ. The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on glucose/insulin metabolism interact with prenatal exposure to famine. *Diabetes Care*. 2006 May;29:1052-7.
- 166 Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, Tsai JH. Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Jul;15:1008-13.
- 167 Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle*. *J Hypertens*. 1998 Jan;16:37-44.
- 168 Pujia A, Gnasso A, Irace C, Dominijanni A, Zingone A, Perrotti N, Colonna A, Mattioli PL. Association between ACE-D/D polymorphism and hypertension in type II diabetic subjects. *J Hum Hypertens*. 1994 Sep;8:687-91.
- 169 Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, Kohli HS, Bhansali A, Sud K, Khullar M. ACE Variants Interact with the RAS Pathway to Confer Risk and Protection against Type 2 Diabetic Nephropathy. *DNA Cell Biol*. 2009 Mar;28:141-50.

- 170 Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35:1270-7.
- 171 John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res*. 1991 Jan 25;19:408.
- 172 Solini A, Giacchetti G, Sfriso A, Fioretto P, Sardu C, Saller A, Tonolo G, Maioli M, Mantero F, Nosadini R. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes in type 2 diabetic sibships in relation to albumin excretion rate. *Am J Kidney Dis*. 1999 Dec;34:1002-9.
- 173 Gray SL, Dalla Nora E, Grosse J, Manieri M, Stoeger T, Medina-Gomez G, Burling K, Wattler S, Russ A, et al. Leptin deficiency unmasks the deleterious effects of impaired peroxisome proliferator-activated receptor gamma function (P465L PPARgamma) in mice. *Diabetes*. 2006 Oct;55:2669-77.
- 174 Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003 Apr;52:910-7.
- 175 Costa LA, Canani LH, Maia AL, Gross JL. The ACE insertion/deletion polymorphism is not associated with the metabolic syndrome (WHO Definition) in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002 Dec;25:2365-6.
- 176 Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, Egan GF, McKinley MJ, Rodger PD, et al. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 6;105:6531-6.
- 177 Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology*. 2001 Jan;142:487-92.