www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio *Italiano*

P. Magni, M. Ruscica,
R. Verna, M.M. Corsi

Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

164

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

Poste Italiane S.p.A. - P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 164 - Marzo 2003 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: La Stampa SpA - Genova

Caleidoscopio
Italiano

P. Magni°, M. Ruscica°,
R. Verna*, M.M. Corsi

*Istituto di Patologia Generale Facoltà di Medicina e Chirurgia, °Istituto di Endocrinologia Facoltà di Farmacia - Università degli Studi di Milano. *Cattedra di Patologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università La Sapienza - Roma*

Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

164

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Informazioni generali. *Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.*

Testo. *La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.*

Frontespizio. *Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.*

Bibliografia. *Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:*

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. Apreliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

Tabelle e figure. *Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.*

Unità di misura. *Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).*

Abbreviazioni. *Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.*

Presentazione della monografia. *Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.*

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista Caleidoscopio rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Questa monografia affronta il tema dell'obesità ed in particolare alcuni recentissimi sviluppi legati alla fisiopatologia ed agli aspetti diagnostici di una proteina, la leptina, una citochina che del tutto recentemente ha dimostrato giocare un ruolo chiave nel regolare l'assunzione del cibo ed il dispendio energetico. Si tratta quindi di un aspetto della "epidemia globale" rappresentata dall'obesità. E' estremamente importante inquadrare il contenuto di questa monografia in una visione globale del tema dell'obesità la cui soluzione comporta strategie di intervento a livello ambientale, educativo, economico e legislativo che devono affiancare gli interventi sanitari con una condivisione di responsabilità che partano dalla prevenzione del fenomeno.

Pertanto la conoscenza del ruolo della leptina a livello scientifico, dovrà essere affiancata da altre competenze ed interventi perchè deve finire l'idea che l'obesità sia semplicemente una responsabilità individuale, della famiglia o dei sanitari. L'epidemia dell'obesità deve far rimettere in discussione la progettazione delle città, dove non esistono più gli spazi dove i bambini possono giocare, le persone passeggiare senza paura la sera, dove l'automobile costituisce il centro di riferimento di tutte le attività, una legislazione che non fa nulla per favorire un'alimentazione corretta e penalizzare altri cibi.

Gli Autori sono di notevole taratura scientifica e fanno parte delle prestigiose Università di Milano e Roma. Il Prof. Roberto Verna dopo la laurea in Scienze Biologiche ha conseguito quella in Medicina e Chirurgia quindi le specializzazioni in Patologia Clinica, Endocrinologia e Scienza dell'Alimentazione. E' stato Visiting Scientist presso il Laboratory of Molecular Biology, National Cancer Institute, N.I.H., Bethesda MD negli USA, presso I.N.S.E.R.M., Unité de Pharmacologie Vasculaire et Renale, Hopital Necker, Paris, Francia ed ancora presso il National Institute of Diabetes Digestive and Kidney Diseases, N.I.H., Bethesda MD negli USA. Il prof. Verna si è occupato della fisiopatologia delle membrane plasmatiche, della fisiopatologia del metabolismo delle lipoproteine e dell'invecchiamento, dell'applicazione delle biotecnologie alla diagnostica di laboratorio. E' autore di oltre 100 pubblicazioni scientifiche sulle principali riviste scientifiche e di 11 libri.

E' Professore Ordinario di Patologia Clinica, prima presso l'Università di L'Aquila quindi presso l'Università di Roma La Sapienza.

Tra i tanti incarichi che ricopre, è Membro della Commissione per la vigilanza ed il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive (CVD) presso il Ministero della Salute, è esperto presso il Consiglio Superiore di Sanità, è vice Presidente Vicario dell'Associazione Italiana Patologi Clinici (AIPaC).

Il Prof. Massimiliano Marco Corsi dopo la laurea in Medicina e Chirurgia, presso L'Università di Milano, ha conseguito il dottorato di ricerca e la specializzazione in Endocrinologia Sperimentale. E' stato prima Ricercatore Universitario di Patologia Generale, quindi Professore Associato di Patologia Clinica. Segretario regionale AIPaC della regione Lombardia ne è diventato Presidente e Delegato AIPaC per la WASPLM (World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine). Il Prof. Corsi ha lavorato come visiting scientist al Karolinska Institutet, Department of Immunology, presso il Microbiology and Tumor Biology Center (MTC), Stoccolma, Svezia; quindi ha soggiornato al ICP, Institute of Cellular Pathology, Unit of Cellular Genetic, della Università Cattolica di Lovanio, Bruxelles, Belgio. E' stato insignito del titolo di "visiting doctor" presso il Dipartimento di Patologia Cellulare e Molecolare, Cancer Center Karolinska (CCK), Stoccolma, Svezia. Autore di 96 lavori di cui 33 su riviste internazionali. Ha pubblicato capitoli in libri, e traduzioni di testi universitari. Attualmente è capo del laboratorio di Patologia Clinica dell'Istituto di Patologia Generale, Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Milano. I campi d'interesse comprendono l'immunopatologia, i markers tumorali, la biochimica patologica e l'immuno-endocrinologia.

Il dottor Paolo Magni ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia, e la Specializzazione in Endocrinologia presso l'Università di Pavia. Grazie ad una Borsa di studio ha lavorato presso il Laboratorio della Prof. Ayalla Barnea, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. Vincitore di concorso per un posto di Ricercatore universitario presso la Facoltà di Farmacia dell'Università di Milano, ottiene quindi il Diploma di Dottore di Ricerca in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche presso l'Università di Milano.

Il Dott. Massimiliano Ruscica dopo la laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, presso la Facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Milano, lavora presso il laboratorio dell'Istituto di Endocrinologia, della Facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Milano, diretto dalla Prof. Motta, in qualità di borsista per poi vincere il concorso per il dottorato in "Scienze Endocrinologiche e Metaboliche".

Sergio Rassu

Introduzione

1. Definizione di Obesità

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha recentemente definito l'obesità "un'epidemia globale". In Europa la percentuale di individui sovrappeso (Body Mass Index - Indice di Massa Corporea - BMI ≥ 25) e la percentuale di individui obesi (BMI ≥ 30) raggiungono, rispettivamente, il 40% e il 12%. Parallelamente all'aumento dell'incidenza dell'obesità e alla progressione degli individui obesi verso valori di BMI via via maggiori, si osserva un aumento del rischio di comparsa di fenomeni di comorbidità quali il diabete mellito di tipo secondo, l'intolleranza al glucosio, l'insulino-resistenza, l'iperlipidemia e l'ipertensione; tutto questo si accompagna ad un aumento del rischio cardiovascolare, tanto è vero che la curva che descrive la correlazione tra BMI e mortalità per eventi cardiovascolari [mortalità = f (BMI)] è di tipo esponenziale.

Dato che il numero di individui obesi raggiunge proporzioni epidemiche, esiste un pressante bisogno di comprendere fino in fondo l'eziologia dell'obesità. Gli studi finora compiuti hanno, in realtà, portato a concludere che le più comuni forme di obesità hanno, probabilmente, un'eziologia multifattoriale che risulta da una complessa interazione tra la biologia del metabolismo energetico e l'ambiente, passando attraverso una eventuale predisposizione genetica, ma anche attraverso aspetti ormonali, metabolici e comportamentali.

Secondo stime recenti, infatti, il 70% delle variazioni osservate in fenotipi correlati con l'obesità è di tipo ereditario; tuttavia i casi di mutazione puntiforme di un singolo gene sono solamente pari al 5%. Finora sono stati individuati più di 250 geni e markers associati all'obesità umana e il loro numero è in continua crescita. Le comuni forme di obesità sono dunque poligeniche.

Nel 1994 l'identificazione del gene *ob,* per mezzo del "positional cloning", e del suo prodotto proteico "leptina", espresso nel tessuto adiposo (*Zhang et al., 1994)* ha costituito una rivoluzione dal momento che ha condotto a considerare il tessuto adiposo come un vero e proprio organo endocrino. La leptina è prodotta soprattutto dal tessuto adiposo sottocutaneo e, in minor misura, dal tessuto adiposo viscerale. Essa svolge un ruolo centrale nella regolazione del peso corporeo, soprattutto nella gestione delle scorte lipidiche; è coinvolta anche nell'angiogenesi, nella riproduzione, nell'invecchiamento.

Esistono numerosi fattori in grado di controllare il bilancio energetico, non solo in periferia, ma soprattutto a livello del sistema nervoso centrale (SNC). Tra essi il più importante segnale oressigenico è costituito dal neuro-

peptide Y (NPY), mentre i più importanti segnali anoressizzanti sono il cocaine-amphetamine related transcript (CART) e peptidi derivati dalla proopiomelanocortina (POMC) quali la melanocortina (α-MSH).

Il ruolo della ghrelina, un peptide di recente scoperta, presente sia a livello del SNC ma principalmente nel tratto gastrointestinale, deve essere ancora totalmente chiarito così come la sua importanza nello sviluppo e nel mantenimento dell'obesità, laddove il sistema endocrino e neuroendocrino possono risultare disturbati.

La comprensione delle correlazioni tra la leptina e i vari assi endocrini potrebbe risultare particolarmente significativa ai fini di una miglior conoscenza di alcune anomalie riscontrabili nell'obesità.

1.1. Classificazione ed eziopatogenesi dell'obesità

In questo contesto vengono prese in considerazione diverse variabili: in particolare la distribuzione regionale del tessuto adiposo e le cause che portano all'insorgenza dell'obesità.

Per avere una corretta stima quali-quantitativa della distribuzione dell'adipe di un soggetto si utilizzano sia tecniche dirette sia indirette.

Le tecniche dirette comprendono l'impedenziometria, la densitometria a raggi X (DEXA), la tomografia assiale computerizzata (TAC), la risonanza magnetica nucleare (RMN), l'ecografia, la misurazione dell'acqua e del potassio corporei totali.

Le tecniche indirette comprendono il BMI, la plicometria (determinazione dello spessore delle pliche cutanee), il WHR (waist/hip ratio - rapporto tra la circonferenza della vita e quella dei fianchi), le tabelle standard, i metodi antropometrici e la clearance della creatinina.

Le tecniche dirette sono i metodi di misura più precisi e permettono la quantificazione della massa grassa corporea rispetto a quella magra, sono però di complessa esecuzione, comportano alti costi, necessitano di personale specializzato e di strutture apposite, inoltre sono ancora scarsamente standardizzate.

Al contrario le tecniche indirette, che si basano su parametri semplici come il peso, l'altezza, l'età, la circonferenza della vita e dei fianchi, la misurazione dello spessore delle pliche cutanee, ecc., sono di semplice e veloce esecuzione e di basso costo, tanto da essere quelle preferibilmente utilizzate in clinica.

Indipendentemente dal criterio utilizzato per la classificazione dell'obesità, si assiste spesso a sovrapposizioni che derivano, inevitabilmente, dalla patogenesi multifattoriale di questa condizione clinica.

1.1.1. Classificazione anatomica

Gli indici di peso corporeo

Una delle prime classificazioni formulate è quella fondata su alcuni indici di peso corporeo quali, ad esempio, il peso ideale.

Il peso ideale, definito come il peso a cui si associa una minore mortalità e una migliore condizione di vita, fu inizialmente calcolato tramite la formula di Broca (*Rotella C.M. L'Obesità 1997, SEE-Firenze)*:

Peso ideale(kg) ♂ = altezza (cm)-100

Peso ideale(kg) ♀ = altezza (cm)-104

Poi modificata da Lorenz (*Rotella C.M. L'Obesità 1997, SEE-Firenze*) in:

Peso ideale(Kg) ♂ = altezza (cm)-100-[(altezza-150)/4]

Peso ideale(Kg) ♀ = altezza (cm)-100-[(altezza-150)/2]

E da Bernhardt (*Rotella C.M. L'Obesità 1997, SEE-Firenze* in:

*Peso ideale = Altezza (cm) * [Circonferenza media toracica (cm)/240)]*

In base alla variazione percentuale del peso del soggetto in esame rispetto al suo peso ideale Stunkard (*Rotella C.M. L'Obesità 1997, SEE-Firenze*) distingue tre gradi di obesità:

1) obesità lieve (l'eccesso ponderale si colloca tra il 20 e il 40% rispetto al peso corporeo ideale);

2) obesità moderata (con un peso in eccesso dal 40% al 100% rispetto al peso ideale);

3) obesità severa (con un peso superiore al 100% del valore ideale).

La forma lieve è quella predominante (90.5%) mentre le altre due forme hanno un incidenza rispettivamente del 9% e dello 0.5%.

Recentemente l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha fissato i nuovi criteri che permettono di classificare l'obesità in base al BMI, ottenibile dalla seguente equazione:

$BMI = peso(kg) / [altezza\ (mt)]^2$.

Come limite superiore di normalità è stato fissato un valore di BMI di 24.9, mentre sono state definite obesità di I, II e III grado quei valori di BMI compresi rispettivamente tra 25 e 29.9, fra 30 e 39.9 e maggiori di 40 Kg / m^2.

Poiché l'incremento di peso comporta un aumento progressivo di complicanze cliniche e necessità di trattamenti più aggressivi, tale classificazione è stata integrata da Bray con indicazioni di tipo terapeutico riguardanti l'utilizzo della sola dieta (a differente contenuto calorico) oppure l'associazione di farmaci o, quando opportuni, di trattamenti chirurgici *(Bray et al., 1992).* Il limite di questa classificazione è di non prendere in considerazione le diverse cause di obesità ma di focalizzare l'intervento terapeutico esclusivamente sul grado di obesità.

La distribuzione del grasso corporeo

Secondo il criterio anatomico più utilizzato, si possono distinguere, sul piano clinico, due forme di obesità: quella ginoide e quella androide. Per questa definizione vengono utilizzati alcuni parametri che misurano la quantità e la distribuzione del tessuto adiposo. Scopo di tali misurazioni è quello di valutare se la distribuzione del tessuto adiposo sia prevalentemente centrale, localizzata cioè a livello addominale (omentale e mesenterico), distribuzione che definisce le forme androidi, oppure periferico (sottocutaneo), in particolare al cingolo pelvico e alla radice delle cosce, che caratterizza le forme ginoidi.

Il valore che si ottiene dalle misurazioni caratterizza i diversi tipi di obesità nel seguente modo:

WHR<0.78 = OBESITA' GINOIDE
0.79<WHR<0.84 = OBESITA' INTERMEDIA
WHR>0.85 = OBESITA' ANDROIDE

(WHR: rapporto circonferenza vita / circonferenza fianchi)

Tale distinzione è risultata di notevole significato clinico; infatti l'obesità di tipo androide, indipendentemente dal metodo di valutazione impiegato, risulta associata ad un'aumentata incidenza di complicanze quali il diabete, le dislipidemie, l'ipertensione arteriosa e la malattia coronarica. Esistono a riguardo talune dimostrazioni dirette, come la correlazione positiva tra l'accumulo di adipe a livello viscerale e la severità di lesioni coronariche e miocardiche su riscontri autoptici, ma anche su studi di tipo epidemiologico. Uno dei riscontri più frequenti nei pazienti con eccesso di adipe viscerale è l'incremento dei livelli plasmatici di trigliceridi e il decremento delle concentrazioni di colesterolo HDL. Utilizzando soprattutto il rapporto WHR o la valutazione mediante TAC è stato, inoltre, evidenziato che una distribuzione centrale dell'adipe presente già in età adolescenziale comporta, in età adulta, un'aumentata morbilità e mortalità per cause cardiovascolari e neoplastiche.

Altri indici di recente introduzione sono il rapporto tra vita e altezza (waist / height) e il rapporto tra tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo denominato AFI il cui valore differisce nei diversi tipi di obesità (Ginoide AFI <1, Androide AFI>1).

Tali indici si correlano con i principali parametri di rischio cardiovascolare. La ragione di tali associazioni morbose risiede nelle caratteristiche metaboliche del tessuto adiposo viscerale. Questo tessuto, metabolicamente molto attivo, è sede di un'intensa attività lipolitica, bene evidenziabile in risposta alla noradrenalina ma anche di una elevata attività lipogenetica, come dimostrato da un aumento del mRNA per la sintesi dell'acetilCoA. Deriva da ciò

un aumentato rilascio di acidi grassi liberi (FFA) nella circolazione portale. A livello epatico, gli FFA costituiscono il substrato per la sintesi dei trigliceridi, favorendo così il processo aterosclerotico.

La cellularità del tessuto adiposo

Esiste una classificazione dell'obesità su base istologica, secondo la quale si distinguono due forme di obesità: una iperplastica e una ipertrofica. Attraverso l'aspirazione di tessuto adiposo sottocutaneo di diversi distretti corporei, è possibile misurare il numero e il volume degli adipociti utilizzando tecniche particolari quali il conteggio delle cellule dopo fissazione o il dosaggio dei trigliceridi e del glicerolo contenuti nelle singole cellule. Si distinguono così forme caratterizzate da un aumento del numero degli adipociti per campo, definite per questo iperplastiche, e forme contraddistinte da un aumento del volume dei singoli adipociti, denominate pertanto ipertrofiche.

Le due forme si distinguono inoltre per caratteristiche fenotipiche e per periodo d'insorgenza. L'obesità iperplastica origina generalmente in età giovanile ed è più spesso di tipo ginoide. Essa può ritrovarsi in età adulta, in particolare in pazienti con notevole eccesso ponderale. La forma ipertrofica ha, invece, un esordio più tardivo, si presenta in genere come obesità androide, pur senza raggiungere i gradi più elevati, si associa ad aumentata mortalità per complicanze cardiovascolari e metaboliche. Particolare importanza sembrano rivestire, per quanto riguarda l'insorgenza dell'obesità, le condizioni di nutrizione durante la vita intrauterina. Una malnutrizione materna nei primi mesi di gravidanza potrebbe alterare i centri ipotalamici che regolano l'assunzione di cibo e predisporre all'obesità in età adulta, mentre una iperalimentazione nel terzo trimestre di gravidanza potrebbe causare una iperplasia degli adipociti già presente alla nascita.

1.1.2. Cenni di classificazione eziologica

Oggi si tende a considerare l'obesità come una condizione clinica caratterizzata da una patogenesi multifattoriale. Questo fa sì che l'obesità resti, in un'altissima percentuale di soggetti, idiopatica (obesità essenziale) mentre solamente nel 5% circa dei casi si può risalire a fattori patogenetici noti e chiaramente identificabili (obesità secondarie).

Un aspetto tuttora dibattuto, inerente l'eziopatogenesi dell'obesità essenziale, riguarda l'importanza dell'iperalimentazione e dei fattori socio-economici. Molti studiosi hanno rilevato l'importanza che le alterazioni qualitative dell'alimentazione possono avere nell'obesità. In effetti, è di comune riscontro il fatto che il soggetto obeso, anche se non mangia esageratamente in termini assoluti, si alimenta in modo non equilibrato introducendo una quantità percentuale esagerata di lipidi e/o di carboidrati. Nonostante attualmen-

te non sia più possibile sostenere che l'obeso è obbligatoriamente un soggetto polifagico, non vi è dubbio che in questi pazienti l'introduzione calorica sia eccessiva rispetto alla spesa energetica. Questa considerazione ha fatto emergere il concetto d'iperalimentazione relativa e ha portato a rilevare che nell'obeso il senso della fame tende a mantenere il peso corporeo ad un livello stabilmente superiore a quello normale.

Le forme più gravi di obesità prevalgono nelle popolazioni con più basso livello socioeconomico. Elementi condizionanti l'incidenza di obesità sono il livello educativo, la situazione occupazionale e i suoi cambiamenti, lo stato civile, le condizioni abitative, le relazioni sociali, l'attività fisica e il consumo di alcool. A dimostrazione di questo, Rosmond *(Rosmond, Lapidus, et al., 1996)* ha condotto uno studio su un'ampia popolazione europea ed ha riscontrato una correlazione negativa tra BMI e WHR da un lato e alcune specifiche condizioni quali il grado di scolarità, la soddisfazione sul lavoro, il matrimonio, le condizioni di alloggio precario e l'attività fisica dall'altro.

Tra le obesità secondarie, che comprendono le forme di origine genetica (sindromi di Alstrom, Carpenter, Cohen, Laurence-Moon, Albright e Prader-Willi), le forme derivanti da disfunzione ipotalamica (solitamente secondarie a lesioni di tipo neoplastico o infiammatorio che coinvolgono i nuclei ipotalamici che controllano l'assunzione di cibo), le forme legate a malattie endocrine (sindrome di Cushing, ipotiroidismo) o metaboliche (NIDDM, ipertensione, dislipidemie, uricemia), le forme legate a disturbi del comportamento alimentare (bulimia), si desidera qui ricordare in particolar modo quelle forme di obesità legate a riduzione del dispendio energetico. Nelle 24 ore, questo è costituito per il 60-75% dal consumo energetico a riposo (REE) cui si aggiunge la termogenesi indotta dal pasto (TEF- Thermogenic Effect of Food), circa il 10% del totale, ed una quota variabile dal 20 al 30% dovuta all'attività fisica.

I soggetti affetti da obesità associata a riduzione del dispendio energetico sono caratterizzati da un REE a riposo del 15% inferiore rispetto al REE teorico calcolato mediante l'equazione di Harris-Benedict (*Rotella C. L'Obesità. 1997, SEE- Firenze*):

*REE teorico♀=655 + [9.6*peso (Kg)] + [1.8*altezza (cm)]-[4.7*età]*

*REE teorico♂=66.4 + [13.7*peso (Kg)] + [5*altezza (cm)]-[6.8*età]*

Esiste un'ampia variabilità individuale del REE che è influenzato dall'entità della massa magra (FFM), con cui si correla positivamente. Il contributo del tessuto adiposo al consumo energetico è circa un quarto di quello della FFM (4.5 Kcal/g), ma nel soggetto obeso può arrivare al 10% del totale. L'idea che l'obesità dipenda da un difetto di consumo energetico ha dato luogo a due teorie diverse. Secondo la prima, il soggetto obeso, per le sue abitudini, condurrebbe una vita particolarmente sedentaria, cosicché il numero delle calorie consumate per produrre lavoro meccanico sarebbe più basso di quello della maggioranza dei soggetti. La seconda teoria sostiene che il pa-

ziente obeso, per far fronte alle proprie necessità energetiche basali o per effettuare un determinato lavoro, consuma una quantità di calorie minore di quella impiegata dal soggetto normale. In particolare, sembra essere l'obesità di tipo ginoide quella maggiormente caratterizzata, già in età infantile, da una riduzione del dispendio energetico anche se i risultati non sono univoci. Il ridotto metabolismo energetico nell'obesità potrebbe dipendere da una alterazione del sistema nervoso simpatico, a sua volta secondario all'insulino–resistenza, considerando l'effetto stimolante dell'insulina sul sistema nervoso simpatico. Di particolare interesse, anche per le possibili implicazioni terapeutiche, è il ruolo determinante che sembra svolgere il recettore β_3-adrenergico nello stimolare la termogenesi a livello del tessuto adiposo bruno. Recentemente è stato individuato per tale recettore un polimorfismo genetico che sarebbe associato ad un aumento del BMI e del grasso viscerale, nonché ad insulino-resistenza.

1.2. Il tessuto adiposo: aspetti endocrini

I due citotipi parenchimali dell'organo adiposo sono gli adipociti bianchi e gli adipociti bruni. In passato questi due citotipi sono stati descritti come membri caratteristici di due distinti tessuti: il tessuto adiposo bianco (WAT = white adipose tissue) e il tessuto adiposo bruno (BAT = brown adipose tissue). Oggi è invece sempre più evidente che l'organo adiposo è composto da un tessuto adiposo misto contenente entrambi i citotipi in quantità variabile: laddove predominano gli adipociti bianchi il tessuto adiposo appare macroscopicamente bianco; laddove invece il tessuto adiposo è prevalentemente costituito da adipociti bruni, appare macroscopicamente bruno.

Gli adipociti bianchi mostrano forma sferica e il loro citoplasma è quasi interamente occupato da grosse gocce lipidiche; da un punto di vista funzionale essi sono coinvolti nell'immagazzinamento e nel rilascio di lipidi al fine di favorire un supporto energetico della durata di ventiquattro ore quale forma di sopravvivenza quando gli intervalli tra i pasti vengono prolungati. Gli adipociti bianchi, inoltre, producono ormoni proteici e citochine, quali il tumor necrosis factor α (TNF α) che condiziona l'insulino-resistenza e l'attivazione del tessuto adiposo bruno; l'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1), coinvolto nell'emostasi; l'angiotensinogeno da cui, in seguito a doppia proteolisi, si origina angiotensina II che condiziona il tono vascolare; la leptina; la resistina, che correla l'obesità al diabete.

Gli adipociti bruni, invece, usano lipidi e altri substrati per produrre calore; il loro citoplasma è ricco di mitocondri in cui è presente una proteina chiamata UCP-1 che si trova esclusivamente nei mitocondri degli adipociti bruni e che ha il compito di dissipare il gradiente protonico elettrochimico, prodot-

to dalla β-ossidazione degli acidi grassi, generalmente riscontrabile tra il compartimento interno e la matrice mitocondriale. Il risultato finale di questo apparente spreco energetico è il rilascio di calore (termogenesi).

Il tessuto adiposo bruno è funzionalmente regolato dal SNC attraverso il suo ramo efferente simpatico. Lo stimolo che induce l'attivazione del tessuto adiposo bruno è il calo della temperatura corporea al di sotto della termoneutralità (definita come la temperatura corporea che non richiede l'attivazione della termogenesi) che, per gli uomini, si colloca tra i 20° e i 22° C. Lo stimolo noradrenergico discendente si serve dei recettori β3 che mediano la lipolisi. Quando lo stimolo noradrenergico viene mantenuto a lungo, si assiste ad una proliferazione degli adipociti bruni, mediata soprattutto da recettori β1 adrenergici, per meglio soddisfare il fabbisogno termogenetico.

L'adipocita bruno, quando lo stimolo noradrenergico viene soppresso, perde le sue caratteristiche "brune" e acquista tutte le caratteristiche morfologiche e le attività funzionali dell'adipocita bianco.

Recentemente è stato appurato che è possibile anche la differenziazione degli adipociti bianchi in adipociti bruni.

La visione che emerge da tutto ciò è che il tessuto adiposo misto non è composto da una quota fissa dei due distinti citotipi, bensì il loro rapporto relativo è modulabile da fattori che agiscono, per esempio, sui recettori β3 adrenergici, presenti in entrambi i citotipi.

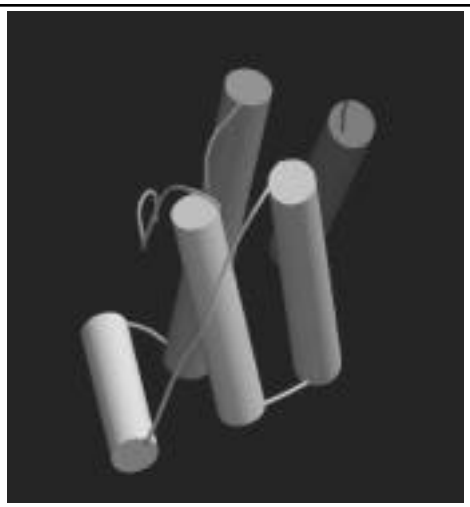
Occorre infine ricordare che gran parte delle suddette osservazioni furono derivate per la prima volta dallo studio di modelli murini transgenici.

1.3. Obesità maschile e femminile a confronto

Secondo studi epidemiologici, l'incidenza dell'obesità in Europa è pari al 8% circa negli uomini e al 9% circa nelle donne. Nella prevalenza relativa di tale patologia e nella distribuzione dell'adipe esistono differenze legate all'età e al sesso; esse sono minime nei due sessi fino alla pubertà, poi nell'uomo si verifica un incremento della massa magra, soprattutto muscolare, in relazione alla produzione di androgeni (testosterone), mentre nella donna aumenta la massa grassa sottocutanea per l'incremento degli estrogeni. In seguito, nell'uomo vi è una tendenza al decremento ponderale dopo i 50 anni, mentre nella donna l'incremento ponderale con l'età è continuo. Nella donna inoltre, la variabilità del BMI è tendenzialmente maggiore che negli uomini. Il numero di gravidanze costituisce un fattore predisponente allo sviluppo dell'obesità tendendo ad aumentare il valore del WHR. Di scarso rilievo sembra, invece, l'effetto dell'allattamento. Un incremento di peso si verifica frequentemente nelle donne anche nel corso della menopausa, con una distribuzione dell'adipe di tipo prevalentemente androide (distribuzione centrale).

2. Leptina

La leptina (dal greco λεπτοσ - magro) è una proteina di 167 aminoacidi codificata dal gene *ob*, originariamente clonata nel topo durante uno studio diretto a identificare il difetto molecolare presente in un ceppo che sviluppava spontaneamente l'obesità: il topo *ob/ob*. Essa è caratterizzata da una sequenza segnale aminoterminale di 21 aminoacidi necessaria per la sua secrezione, che è rimossa durante la maturazione della proteina; la forma circolante è, infatti, costituita da 146 aminoacidi *(Zhang, Proenca et al., 1994)*. La leptina è anche chiamata proteina *ob* ed è strutturalmente correlata alla famiglia delle citochine (*Madej, Boguski et al., 1995*).



- ❒ Proteina composta da 146 aa (16 kDa)
- ❒ Struttura correlata alle citochine
- ❒ Espressa ubiquitariamente, principalmente prodotta dal tessuto adiposo bianco
- ❒ Presente nel plasma in due forme: libera (monomerica) ed una legata a proteine vettrici

Figura 1. La leptina.

2.1. Leptina: un ormone in grado di collegare assunzione di cibo, dispendio energetico e funzione riproduttiva

La regolazione di sistemi complessi - quali il metabolismo energetico, la funzione riproduttiva e il comportamento alimentare - è il risultato della trasmissione di molteplici vie di segnale, la cui azione ha origine sia a livello di strutture centrali dell'organismo che a livello periferico.

Nei mammiferi, ed in particolare nella specie umana, sono state identificate come responsabili di tale processo numerose molecole-segnale di tipo ormonale; il progressivo chiarirsi delle loro singole e specifiche funzioni ha portato alla definizione del concetto di sistema ormonale ridondante, ovvero la possibilità che più molecole regolatorie, con azioni parzialmente sovrapposte, siano state selezionate durante l'evoluzione al fine di mantenere la vita di ogni singolo organismo e di salvaguardare le diverse specie *(Wade, Schneider, 1992; Woods, Seeley et al., 1998)*. Alterazioni di questi segnali possono essere causate da fattori genetici, ormonali, ambientali e si manifestano come inefficienza della regolazione dell'omeostasi energetica e dell'asse riproduttivo. Infatti, da osservazioni riferite a situazioni patologiche sia in animali che nell'uomo, è emerso come le funzioni di assunzione di cibo, spesa energetica e riproduzione siano strettamente connesse. A questo riguardo è noto che nei roditori e negli uomini l'obesità è associata a numerosi disturbi riproduttivi *(Lane, Dickie, 1954; Norman, Clark, 1998)*, così come la diagnosi di anoressia nervosa è strettamente connessa alla presenza di amenorrea *(Stewart, 1992)*. Da un punto di vista biochimico e molecolare, queste osservazioni sono espresse in uno scenario estremamente complesso, con confini ancora sconosciuti *(Kalra, Dube et al., 1999)*. La ricerca in questo settore ha condotto, negli ultimi anni, all'identificazione di una miriade si sostanze regolatorie che prendono parte sia alla regolazione dell'assunzione di cibo e del metabolismo energetico che alla funzione riproduttiva. Gli esempi più rilevanti includono le molecole oressigeniche, come gli oppioidi endogeni, il neuropeptide Y (NPY), la galanina, l'ormone concentrante la melanina, le orexine/ipocretine e segnali anoressigenici, come i peptidi correlati al *corticotropin-releasing hormone*, la neurotensina, la melanocortina, i trascritti correlati alla cocaina-anfetamina e tante altre (*Pu, Karla et al*., 1999). La maggior parte di questi neuropeptidi, se non tutti, ha origine ed agisce nel sistema nervoso centrale (SNC), soprattutto in specifiche aree ipotalamiche, modulando la spesa energetica, l'assunzione di cibo, la preferenza dei nutrienti e, in molti casi, regolando anche gli aspetti neuroendocrini dell'asse riproduttivo *(Kalra, 1996)*. Questa prospettiva è stata rivoluzionata nel 1994, con la scoperta di un segnale, un ormone, proveniente dal compartimento periferico (tessuto adiposo), ma in grado di portare informazioni soprattutto alle strutture centrali (ipotalamo): per la prima volta veniva, così,

identificata una molecola che integrava in se tutte queste importanti funzioni fisiologiche, percorrendo l'organismo in senso inverso rispetto a tutte le molecole finora menzionate. Questa molecola é la LEPTINA *(Zhang, Proenca et al., 1994)*.

2.1.1 Il circuito leptina-neuropeptide Y

Ad oggi restano per lo più sconosciuti tutti i meccanismi con cui il peso corporeo e il contenuto in grassi di un organismo sono mantenuti pressoché costanti e vicini a predeterminati *set-points* (*Wang, Bing et al., 1997*). Si deve poi tenere conto del fatto che l'omeostasi energetica è garantita dalla modulazione di molteplici sistemi neuronali selettivi e da segnali periferici; inoltre, il bilancio energetico-metabolico dipende da fattori ambientali, dalla disponibilità e assunzione di cibo e dalla richiesta di energia fisica (*King, Widdow - son et al., 2000*). La coordinazione di queste funzioni fisiologiche avviene probabilmente nell'ipotalamo, dove si ha l'integrazione di segnali centrali e periferici (*Wang, Bing et al., 1997*): qui un ruolo fondamentale è giocato dal circuito leptina-NPY. Queste due sostanze sono funzionalmente correlate e sono caratterizzate da attività opposte: l'NPY (presente soprattutto nell'ipotalamo, ma largamente diffuso nel sistema nervoso sia centrale sia periferico) stimola l'assunzione di cibo, riduce la spesa energetica ed innalza l'insulina plasmatica; al contrario, la leptina (prodotta negli adipociti, secreta nella circolazione e attiva soprattutto nel SNC) riduce sia l'assunzione di cibo che i livelli di insulina circolante ed aumenta il dispendio energetico *(Kalra, 1996; Rosenbaum, Leibel 1998)*.

Alcuni studi hanno confermato l'esistenza di una reciproca regolazione tra questi due ormoni: l'mRNA codificante per il recettore della leptina è stato identificato a livello dei neuroni NPY-secernenti del nucleo arcuato (ARC) *(Mercer, Hoggard et al., 1996)*, dove la leptina provoca una diminuzione della sintesi dell'RNAmessaggero dell'NPY, insieme ad una diminuzione della sua secrezione. Nei topi *ob/ob*, modelli animali caratterizzati da un difetto genetico che non permette la produzione di leptina biologicamente attiva, i livelli centrali di NPY sono costitutivamente elevati *(Zhang, Bao et al., 1994; Stephens, Basinski et al., 1995)* e la somministrazione di leptina ricombinante ne provoca una considerevole riduzione *(Halaas, Gajiwala et al., 1995; Pelleymounter, Cullen et al., 1995)*. Nel ratto l'infusione intracerebroventricolare di leptina, oltre ad inibire l'assunzione di cibo, provoca, già dopo 6 ore, una riduzione dell'mRNA dell'NPY e una diminuzione del peptide stesso *(Wang, Leibowitz, 1997)*. Da un altro studio è emerso che la leptina presente nel sistema circolatorio è in grado di passare la barriera ematoencefalica e raggiungere i nuclei ipotalamici mediobasale e arcuato, tramite un sistema di trasporto saturabile, insulina indipendente *(Banks, Kastin et al., 1996)*. L'effetto della leptina sul comportamento alimentare e sul dispendio energe-

tico può, quindi, essere ricondotto, almeno in parte, ad un'alterazione dell'omeostasi dell'NPY. A sua volta, l'NPY è in grado di influenzare l'espressione genica della leptina: nei ratti l'infusione intracerebroventricolare cronica del peptide determina iperinsulinemia, ipercorticosteronemia ed un considerevole aumento dell'espressione del gene *ob* a livello del tessuto adiposo bianco. Probabilmente l'aumento dei livelli di mRNA della leptina è essenzialmente dovuto all'iperinsulinemia indotta dall'NPY. E' stato, infatti, dimostrato che un'infusione cronica d'insulina determina un aumento della trascrizione del gene *ob* paragonabile a quello ottenuto con l'NPY *(Sainsbury, Cusin et al., 1996)*. Inoltre, è recentemente emerso che l'NPY, grazie all'interazione con recettori di tipo Y1 altamente espressi negli adipociti umani, è in grado di stimolare il rilascio di leptina *(Serradeil-LeGal, Lafontan et al., 2000).*

I risultati di questi studi sembrano ribadire l'esistenza di un circuito leptina-NPY, per quanto poco sia conosciuto dei meccanismi che regolano le interazioni tra neuroni NPY-secernenti e leptina, o riguardo eventuali modulatori diretti del *sistema (King, Widdowson et al., 2000)*. L'opposta attività di leptina e NPYsembra, inoltre, essere rilevante a livello del controllo del sistema riproduttivo: infatti, a livello dei neuroni LHRH secernenti, la leptina stimola il rilascio dell'ormone, mentre l'NPY lo inibisce *(Kalra, Dube et al., 1999; Magni, Vettor et al., 1999)*.

Infine, non in tutti i modelli sperimentali è stata osservata un'azione modulatoria della leptina sull'NPY; infatti, è stato recentemente dimostrato che la leptina non è in grado di modificare il rilascio di NPY a livello di fettine isolate da ipotalamo di ratto *(King, Widdowson et al., 2000)*.

2.2. Localizzazione anatomica

Nell'uomo e nei roditori il gene *ob*, codificante per la leptina, è principalmente espresso a livello del tessuto adiposo bianco *(Zhang, Proenca et al., 1994)*; l'mRNA del gene *ob* è presente, inoltre, in misura minore a livello del tessuto adiposo bruno *(Maffei, Halaas et al., 1995).* Negli adulti, infatti, l'entità dell'mRNAe la quantità di leptina circolante sono direttamente correlate con la massa adiposa e con le dimensioni degli adipociti. In ogni modo l'espressione del gene è stata osservata anche nel cuore (*Green, Maffei et al., 1995*), nella placenta *(Senaris, Garcia-Caballero et al., 1997)*, nella cartilagine, nell'osso fetale e nei follicoli piliferi *(Hoggard, Hunter et al., 1997).*

2.2.1 Aspetti molecolare della leptina e controllo della sua espressione

Struttura del gene, dell'mRNA e della proteina

Il gene umano della leptina, localizzato sul cromosoma 7 in posizione

q.31.3 *(Green, Maffei et al., 1995)*, è costituito da tre esoni con due regioni codificanti separate da due lunghi introni (circa 10 kb e 2 kb). Il promotore del gene è stato sequenziato e clonato: procedendo in direzione 5' dal sito d'inizio della trascrizione s'incontrano varie sequenze consenso putative per fattori di trascrizione, in particolare, un elemento responsivo a C/EBPα, una sequenza consenso per SP-1, un elemento responsivo ai glucocorticoidi (GRE) e un elemento responsivo al cAMP (CRE).

Il punto di legame con il secondo esone si trova alla posizione Glu +49; da uno *splicing* alternativo si forma un mRNAdes-Gln49 rilevabile con l'analisi RT-PCR, ma non è noto se questa forma abbia o meno un'importanza fisiologica.

La proteina secreta è caratterizzata da 146 aminoacidi e possiede un ponte cisteinico all'estremità carbossiterminale fondamentale per l'attività della leptina stessa. Sebbene la struttura primaria della leptina non risulti correlata con quella di alcuna proteina nota, la struttura terziaria, determinata mediante studi di diffrazione dei raggi X, possiede alta omologia con quella delle citochine con quattro domini ad elica *(Zhang, Basinski et al., 1997)*. Alcuni studi hanno evidenziato la formazione di dimeri di leptina, anche se il loro significato non è ancora noto. Va, peraltro, osservato che, per alcuni membri della famiglia delle citochine, la formazione di dimeri è di fondamentale importanza per l'attivazione del recettore *(Sprang, Bazan, 1993)*.

Regolazione dell'espressione genica

Numerosi fattori fisiologici e ambientali sono implicati nella regolazione dell'espressione genica della leptina. Dato che l'espressione genica della proteina è in pratica limitata al tessuto adiposo - sebbene sia stata dimostrata la produzione di leptina a livello cerebrale *(Morash, Li et al., 1999; Wiesner, Vaz et al., 1999)* - e, poiché i livelli di leptina circolante sono strettamente correlati con i depositi di trigliceridi e la massa grassa, è interessante considerare il meccanismo molecolare, tessuto adiposo specifico, che controlla la trascrizione del gene *ob*. Infatti, in questo tessuto, tale gene è regolato in maniera opposta da due fattori di trascrizione, C/EPBα e PPARγ (*peroxysome proliferator activating receptor* γ), che controllano anche la differenziazione degli adipociti.

Studi condotti su colture primarie di adipociti hanno dimostrato che l'espressione del gene della leptina è indotta da C/EPBα mediante il suo legame ad un sito presente, 15 pb circa a monte del TATA box, nella regione promotrice del gene *(He, Chen et al., 1995; Miller, Vos et al., 1996; Hollenberg, Susulic et al. 1997)*: la presenza di questo fattore è fondamentale per la massima attività del promotore stesso.

Al contrario, il tiazolidinedione, una sostanza antidiabetica, legandosi ed attivando il PPARγ, riduce l'espressione della leptina sia nei topi che in adipociti isolati *(DeVos, Lefebvre et al., 1996; Kallen, Lazar, 1996)*, grazie ad un effetto diretto sulla regione promotrice del gene *(Hollenberg, Susulic et al., 1997)*.

In colture di adipociti umani, il troglitazone, un altro tiazolidinedione, riduce del 40% i livelli di mRNAdella leptina, sebbene il trattamento di soggetti obesi con questa sostanza non ne abbassi i livelli circolanti *(Nolan, Ofelsky et al., 1996).*

Un locus sul cromosoma 2p21 codifica per un fattore che sembra essere importante nella regolazione dei livelli di leptina: per quanto il gene non sia stato ancora identificato, un candidato è quello della POMC (pro-opio-melanocortina) *(Comuzzie, Hixson et al., 1997)*, un precursore dell'ACTH, il quale regola a sua volta la produzione di glucocorticoidi (GC), anch'essi coinvolti nella regolazione del gene *ob (DeVos, Saladin et al., 1995)*. Nei ratti e negli adipociti isolati di ratto, infatti, i livelli di mRNA della leptina aumentano in seguito a trattamento con glucocorticoidi *(Slieker, Sloop et al., 1996)*. Infatti, a livello del promotore del gene umano e murino, sono state localizzate due metà di un elemento responsivo ai GC; non è noto, però, se queste siano attivamente coinvolte nella regolazione della trascrizione genica. Gli elevati livelli di cortisolo associati alla sindrome di Cushing non sembrano, in ogni caso, alterare i livelli di leptina.

Oltre alla regolazione associata alla differenziazione del tessuto adiposo, l'espressione del gene *ob* è controllata da numerosi fattori ormonali, ambientali e dietetici. Nei ratti, i livelli dell'RNA messaggero della leptina diminuiscono in seguito a digiuno e tornano ad innalzarsi dopo rialimentazione o dieta ricca di grassi *(Frederich, Lollmann et al., 1995; Saladin, DeVos et al., 1995)*; l'esercizio fisico, come la corsa sulla ruota, riduce i livelli di leptina. Nei roditori questi cambiamenti sono dovuti alla variazione dei livelli di insulina plasmatica, ormone che regola positivamente l'espressione del gene *ob* sia in vivo che in vitro. Infatti, nei ratti l'induzione del diabete mediante streptozotocina determina una diminuzione dei livelli di mRNA della leptina, che sono rapidamente ristabiliti in seguito a trattamento con insulina. Anche nell'uomo il digiuno riduce i livelli di leptina, senza che vi sia un apprezzabile cambiamento del peso corporeo; mentre un giorno di alimentazione eccessiva (120 cal/kg ogni 12 ore) li innalza del 40% *(Kolaczynski, Ohannesian et al., 1996)*. Tuttavia, nell'uomo, a differenza dei roditori, una restrizione di cibo per un breve periodo non influenza l'espressione del gene *ob (Maffei, Halaas et al., 1995)*: cambiamenti acuti dei livelli di insulina hanno solo un lieve effetto sull'espressione genica della leptina; i livelli devono permanere alti a lungo per indurre l'espressione del gene *ob*. Sembra, infatti, che vi sia una diversa regolazione del gene *ob* nelle due specie: in entrambe si osserva un picco notturno dei livelli di leptina, ma, mentre nei roditori questo coincide con l'inizio del pasto, nell'uomo ciò non si verifica. Nei ratti il digiuno inibisce l'innalzamento notturno della leptina che viene, però, immediatamente ristabilito dalla somministrazione di cibo o da un'unica iniezione di insulina *(Saladin, DeVos et al., 1995)*. E' importante notare che nell'uomo i livelli di leptina non variano dopo un pasto normale; ciò conferma che questa sostanza non è un segnale di sazietà

correlato con l'assunzione di cibo ma, invece agirebbe a lungo termine *(Considine et al., 1995)*.

Nel topo, lesioni ipotalamiche provocate mediante glutammato di sodio od oro tioglucosio hanno determinato un aumento di NPY a livello centrale e di insulina in periferia associato a iperfagia, ridotto dispendio energetico e aumentati livelli di mRNA della leptina *(Funahashi, Shimomura et al., 1995; Frederich, 1995)*. Mediatori di questa risposta sono appunto l'NPYe l'insulina, poiché la somministrazione intracerebroventricolare di NPY *(Sainsbury, Cusin et al., 1996)* e l'infusione cronica di insulina comportano un aumento dell'mRNA della leptina.

Nel topo un'esposizione acuta al freddo sopprime l'espressione genica della leptina nel tessuto adiposo bianco e il trattamento con noradrenalina replica tale effetto: questo suggerisce un coinvolgimento del sistema nervoso simpatico nella regolazione del gene *ob (Trayhurn, Duncan et al., 1995)*. Infatti, il Bt2cAMP, l'isoproterenolo e gli agonisti del recettore β3 adrenergico riducono i livelli di mRNAdella leptina sia in vivo sia in vitro *(Slieker, Sloop et al.; 1996, Collins, 1996)*. Un elemento responsivo al cAMP(CRE) è presente nella regione promotrice del gene *ob*, ma un suo coinvolgimento nell'espressione di tale gene non è stato provato.

2.3. Livelli plasmatici

I livelli di leptina plasmatici sono strettamente correlati con il sesso e con la massa adiposa *(Cuillard, Mauriege et al., 1997; Nagy, Gower et al., 1997)*, ma è chiaro che questi due fattori non possono da soli spiegare la grande variabilità nella concentrazione di leptina circolante.

A volte, infatti, individui che presentano BMI simili hanno livelli di leptina plasmatica molto diversi *(Baumgartner, Ross et al., 1999)*. Gli studi clinici volti a esaminare il possibile coinvolgimento non solo della massa adiposa, ma anche della sua distribuzione, hanno dato risultati contrastanti *(Wauters et al., 1999)*. Studi compiuti in vitro hanno mostrato che il grasso sottocutaneo sintetizza leptina più efficientemente di quello viscerale *(Suzuki, Watanabe et al., 1993; Lefebvre, Laville et al., 1998)*. La sintesi della leptina, però, non avviene esclusivamente nel tessuto adiposo, ma un contributo rilevante alla concentrazione plasmatica periferica di leptina viene da una secrezione attiva a livello del cervello *(Wiesner, Vaz et al., 1999)*.

In vivo, si è evidenziata, utilizzando gli ultrasuoni, una notevole differenza nello spessore del tessuto adiposo sottocutaneo in donne obese rispetto a uomini che hanno un BMI comparabile *(Shimizu, Shimomura et al., 1997; Minocci, Savia et al., 2000)* e questo potrebbe sostenere l'ipotesi di una stretta relazione fra livelli di leptina e spessore della massa adiposa sottocutanea, ma non di quella viscerale preperitoneale, anche se non è sufficiente per spie-

gare appieno il dimorfismo sessuale della leptina plasmatica. Comunque, non vi è nessuna differenza nella secrezione di leptina da parte dei due diversi tipi di grasso in uomini normopeso *(Alessi, Peiretti et al., 1997)*. Altri studi eseguiti in vivo tramite misure antropometriche, stabiliscono che i livelli di leptina sono dipendenti solo dalla massa grassa e non dalla sua distribuzione *(Pi-Sunyer, Laferrere et al., 1999)*.

Nell'individuo obeso la leptina, oltre ad avere livelli plasmatici superiori che nel normopeso, presenta un diverso profilo per quanto riguarda il rapporto tra la forma libera e quella legata. In questa patologia, infatti, la leptina circolante si trova maggiormente nella forma libera, mentre nell'individuo sano è prevalentemente legata a specifiche proteine di trasporto.

2.4. Recettori della leptina e vie di segnale

Le azioni biologiche della leptina sono mediate dall'interazione con recettori specifici (Ob-Rs) *(Tartaglia, Demski et al. 1995; Tartaglia 1997)*, che sono il prodotto del gene *db (Chen, Charlat et al. 1996; Lee, Proenca et al. 1996)*, localizzato a livello del cromosoma 4. L'RNA nativo può subire uno splicing alternativo dando origine ad almeno 5 diverse isoforme recettoriali: l'isoforma lunga (Ob-Rb), altamente espressa in poche aree specifiche, soprattutto a livello ipotalamico; tre isoforme corte (Ob-Ra, Ob-Rc e Ob-Rd) *(Fei, Okano et al., 1997)*, di cui la più caratterizzata è Ob-Ra, maggiormente diffusa e probabilmente coinvolta nel meccanismo di trasporto della leptina attraverso la barriera emato-encefalica *(Bjorbaek, Elmquist et al., 1998)*; ed una isoforma solubile (Ob-Re), costituita dalla sola porzione extracellulare *(White, Tartaglia, 1996)*.

L'Ob-R è caratterizzato da un singolo dominio transmembrana e presenta alta omologia con i recettori di classe I delle citochine, in modo particolare con il recettore per l'interleuchina-6 *(Baumann, Morella et al. 1996)*. Nei roditori le diverse isoforme recettoriali sono ampiamente distribuite a livello di plesso coroideo, ipotalamo, stomaco, fegato, tessuto adiposo, gonadi, utero, placenta, ecc. *(Tartaglia, Demski et al. 1995; Caro, Sinha et al. 1996; Fei, Okano et al. 1997)*. Gli Ob-Rs sono caratterizzati da un dominio di legame extracellulare di 840 aminoacidi, da un dominio transmembrana di 34 aminoacidi e da un dominio intracellulare variabile. L'isoforma corta Ob-Ra ha un dominio citoplasmatico di 34 aminoacidi, Ob-Rc di 32 aminoacidi, Ob-Rd di 40 aminoacidi. L'isoforma lunga presenta un dominio intracellulare di 302 aminoacidi che contiene siti potenziali di legame per la Janus chinasi (JAK), definiti box1 e box2, ed una potenziale sequenza consenso per il legame con i trasduttori del segnale e gli attivatori della trascrizione (STAT) *(Ghilardi, Ziegler et al. 1996; Tartaglia 1997)*. I recettori delle citochine infatti, così come quelli per la lepti-

na, non hanno attività enzimatica intrinseca, ma trasmettono il segnale attraverso il legame non covalente con la famiglia di enzimi ad attività tirosino-chinasica JAK. In seguito al legame della leptina con il proprio recettore di membrana, si ha la dimerizzazione dei recettori: diversamente da altre citochine, Ob-Rb sembra che sia presente sulla membrana come un omodimero, attivato da un cambiamento conformazionale successivo al legame *(Taga, Kishimoto, 1997)*. Bjorbaek et al. hanno dimostrato che la chinasi JAK2 è attivata da Ob-Rb *(Bjorbaek, Uotani et al. 1997)*. I residui di tirosina che possono essere fosforilati nel dominio intracellulare di Ob-Rb sono tre (Tyr^{985}, Tyr^{1077} e Tyr^{1138}), ma solo Tyr^{985} e Tyr^{1138} sono effettivamente fosforilati, mediando rispettivamente l'attivazione di SHP-2 e di STAT3. Le proteine STAT fosforilate (p-STAT3), dimerizzano e traslocano nel nucleo dove si legano a specifici elementi responsivi del DNA; inoltre inducono l'espressione di SOCS3, una proteina in grado di legarsi in modo specifico a JAK2, inattivandola e bloccando quindi la trasmissione del segnale *(Bjorbaek et al. 1999)*. Diversi studi hanno dimostrato che l'espressione di SOCS3 è aumentata dopo l'attivazione di Ob-Rb soprattutto a livello ipotalamico, mediando l'inibizione a feed-back della leptina *(Bjorbaek, Elmquist et a. 1998; Elias et al. 1999; Tsumanuma et al. 2000)*. La fosforilazione di SHP-2 media l'attivazione di ERK *(Bjorbaek et al. 2001)*.

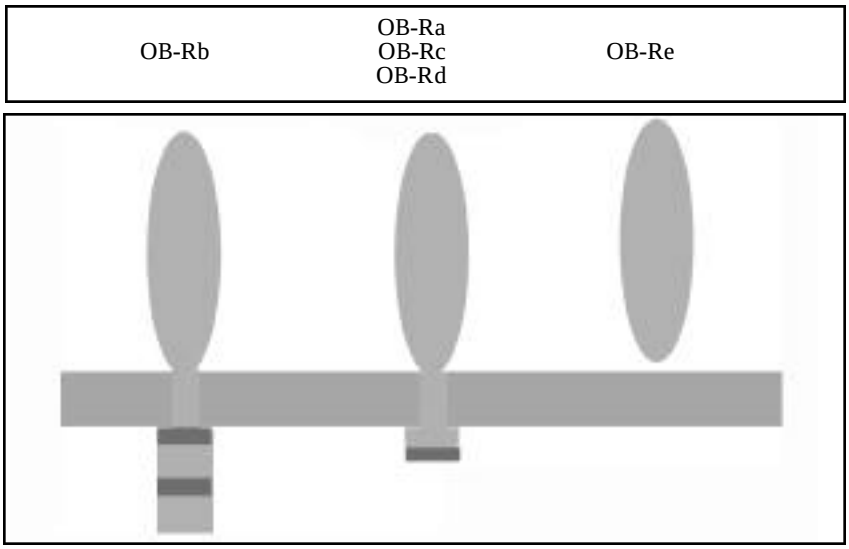


Figura 2. I recettori della leptina (OB-Rs). OB-Rb: isoforma lunga (prevalentemente a livello ipotalamico); OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd: isoforme corte (apparato riproduttivo e altri tessuti); OB-Re: solubile (proteina di legame plasmatica) Vie di segnale: JAK-STAT, MAP-chinasi, IP3-chinasi.

Le isoforme corte del recettore erano generalmente ritenute incapaci di trasdurre il segnale; in cellule transfettate CHO, che esprimono stabilmente la forma corta del recettore OB-Ra, si osserva un aumento del livello di fosforilazione di MAP-chinasi *(Yamashita, Murakami et al. 1998)*: questo dato sembra suggerire che anche alcune forme corte del recettore siano in grado di trasmettere segnali intracellulari attraverso la via che implica l'attivazione della MAP-chinasi.

Successivamente all'interazione con il proprio recettore di membrana, la leptina viene internalizzata nella cellula con un processo di endocitosi: per questo processo sono fondamentali i residui aminoacidici 8-29 del dominio intracellulare del recettore, come dimostrato da studi su recettori Ob-Ra mutati (la delezione degli ultimi 26 aminoacidi della porzione citosolica del recettore riduce del 60% l'internalizzazione della leptina dopo 5 minuti dal legame) *(Uotani, Bjorbaek et al.1999)*. Dopo l'ingresso nel citoplasma, il complesso leptina-recettore va incontro a degradazione mediata dai lisosomi *(Uotani, Bjorbaek et al.1999)*.

I recettori della leptina inoltre possono venire regolati-negativamente dal loro ligando. In particolare, Ob-Rb risultano più sensibili di Ob-Ra, con una riduzione dose-dipendente del legame fino all'80% *(Uotani, Bjorbaek et al.1999).*

2.5. Effetti fisiologici della leptina e suo coinvolgimento nell'obesità

La leptina è, quindi, coinvolta nel controllo del bilancio energetico, ma gioca un ruolo fondamentale anche nella regolazione di diversi sistemi neuroendocrini, quali il sistema riproduttivo, l'ormone della crescita e la prolattina, il sistema ematopoietico ed è in grado di influenzare la proliferazione cellulare.

2.5.1 Leptina e bilancio energetico

La leptina ha la principale funzione di trasmettere al SNC lo stato di riserva energetica dell'organismo, agendo anche da sensore del bilancio energetico; infatti, i livelli di leptina, sia nell'uomo che nei roditori, sono di norma proporzionali alla massa adiposa (*Frederich et al., 1995; Maffei et al., 1995*). E' noto che lievi cambiamenti nel bilancio energetico possono determinare un considerevole effetto a livello dell'espressione del gene ob: nei soggetti obesi una riduzione del 10% del peso corporeo provoca una diminuzione del 53% della leptina circolante (*Considine et al., 1996*), mentre un aumento in peso della stessa entità ne determina un innalzamento del 300% (*Kolaczynski et al., 1996*).

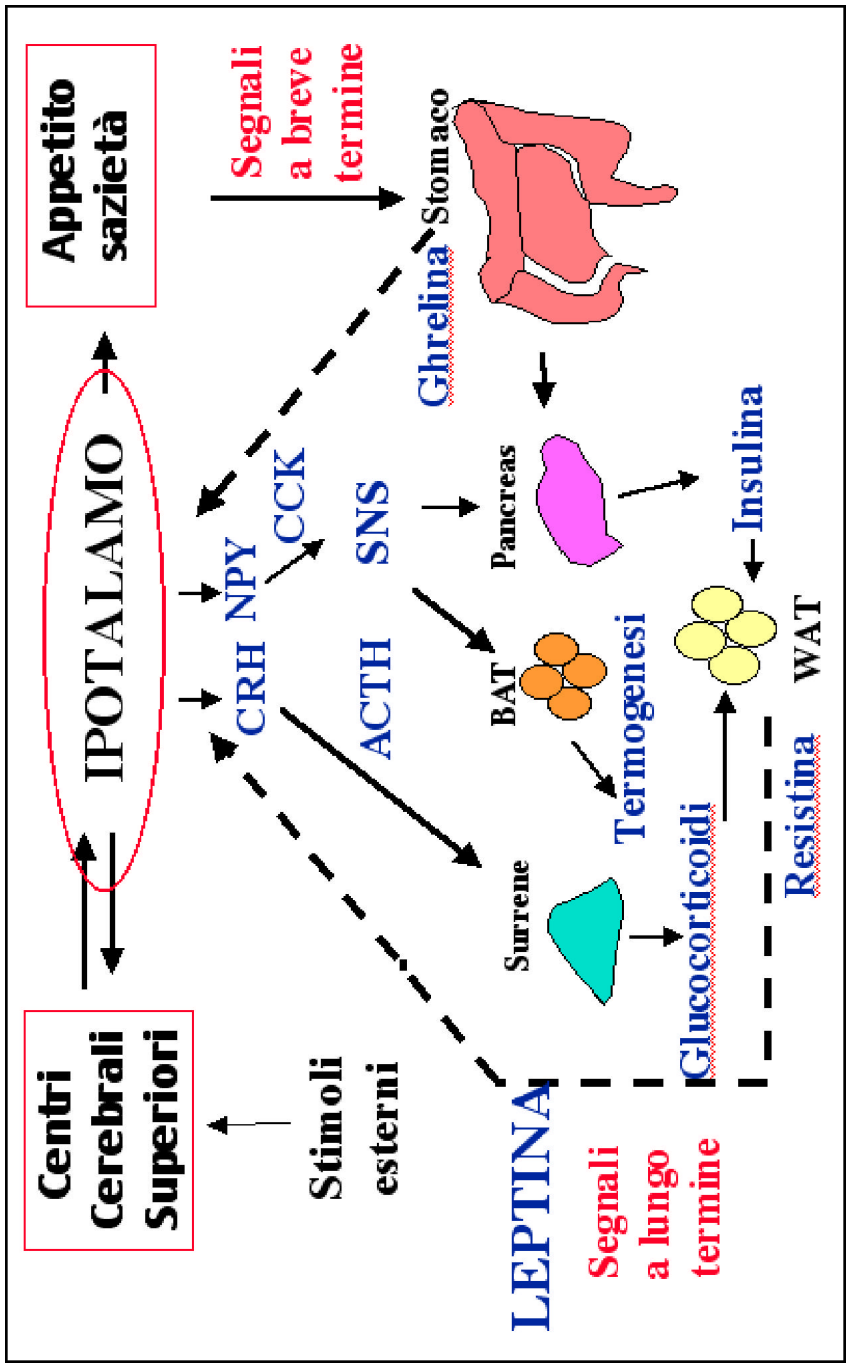


Figura 3. Effetti fisiologici della leptina e segnali coinvolti nel bilancio energetico.

Nei topi *ob/ob* la somministrazione sistemica o intracerebroventricolare di leptina ricombinante provoca una diminuzione dose-dipendente dell'assunzione di cibo, una riduzione del peso corporeo, una diminuzione dei depositi di grasso e un aumento del metabolismo energetico (*Halaas et al., 1995*). Simili effetti si osservano anche nei topi non obesi in seguito a somministrazione intraperitoneale di elevati livelli di leptina (*Collins et al., 1996*).

La somministrazione di leptina nel ventricolo laterale determina un'alterazione del comportamento alimentare e del bilancio energetico (*Campfield et al., 1996*). La maggior parte degli effetti della leptina si esplicano, infatti, a livello del SNC, in quanto essa è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, probabilmente a livello del plesso coriodeo, mediante l'utilizzo di un sistema di trasporto saturabile (*Banks et al., 1996*).

A livello ipotalamico (*Stephens et al., 1995*), ed in particolare a livello dell'ARC (*Schwartz et al., 1996*), è stata rilevata la presenza di recettori OB-Rb ad alta affinità per la leptina. Fra questi gruppi neuronali, bersaglio principale della leptina sono proprio i neuroni NPY-secernenti. Infatti, la somministrazione cronica dell'ormone riduce l'espressione genica dell'NPY nell'ARC e sopprime il rilascio del peptide in ipotalami isolati di ratto (*Stephens et al., 1995; Schwartz et al., 1996*).

Nei topi ob/ob l'espressione dell'NPY a livello ipotalamico è costitutivamente aumentata; in seguito al trattamento con leptina riscontriamo una diminuzione dei livelli di NPY e questo prima che vi sia un qualsiasi cambiamento del peso corporeo (*Stephens et al., 1995*).

Il ruolo dell'NPY come mediatore delle azioni della leptina è stato meglio caratterizzato da studi su topi *ob/ob* knocked out per il gene dell'NPY (*Erickson et al., 1996*): l'assenza del peptide riduce, ma non elimina completamente gli aspetti correlati all'obesità dei topi ob/ob ad indicare che l'NPY non è il solo bersaglio della leptina. Infatti, da studi effettuati su ipotalami isolati di ratto, è emerso che il trattamento con leptina aumenta il livello di mRNA ipotalamico del CRH, un peptide che ha un'azione opposta a quella dell'NPY nella regolazione dell'assunzione di cibo (*Schwartz et al., 1997*).

Oltre che a livello centrale, i recettori per la leptina sono stati trovati anche a livello periferico, sebbene nella maggior parte dei tessuti la forma predominante sia rappresentata da quella troncata non funzionale (*Tartaglia et al., 1995*). Le cellule β-pancreatiche di ratto presentano la forma lunga del recettore (*Kieffer et al., 1997*) e l'attivazione di tale recettore, aumentando il potenziale di membrana e riducendo il calcio intracellulare, inibisce il rilascio di insulina (*Emilsson et al., 1997*). L'inibizione diretta del rilascio di insulina potrebbe essere una spiegazione dei bassi livelli di insulina riscontrati nei topi *ob/ob* trattati con leptina (*Stephens et al., 1995*). Negli adipociti isolati di ratto la leptina contrasta l'attivazione, mediata dall'insulina, del trasporto di glucosio, della sintesi del glicogeno e della lipogenesi (*Muller et al., 1997*),

sebbene in queste cellule non siano stati identificati recettori per l'ormone. Nelle colture di isole pancreatiche di ratto la leptina diminuisce il contenuto di trigliceridi aumentando l'ossidazione degli acidi grassi e riducendo l'esterificazione dei lipidi (*Shimabukuro et al., 1997*). Tale osservazione può essere estesa ad altri tessuti come il fegato e il muscolo. Queste azioni periferiche della leptina potrebbero essere fisiologicamente rilevanti nel controllo dei livelli basali di insulina e del contenuto di trigliceridi nei tessuti.

Infine, la leptina sembra essere coinvolta nell'insulino-resistenza: su linee cellulari insulino-responsive come HepG2 (*Cohen et al., 1996*) o fibroblasti rat1 (*Kroder et al., 1996*), essa determina una diminuzione della fosforilazione dell'IRS-1 (*insulin receptor substrate*) stimolata dall'insulina, ma aumenta l'attività della PI3 chinasi. Al contrario, sulla linea cellulare di mioblasti C2C12, la leptina ha un'azione insulino-simile in cui è implicata l'attivazione della PI3 chinasi e della protein chinasi C (*Berti et al., 1997*).

In ogni modo l'attività periferica della leptina è ancora poco chiara e in fase d'attento studio.

2.5.2. Leptina e obesità

L'obesità rappresenta la più frequente condizione patologica derivante da disordini alimentari delle società occidentali e costituisce uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di malattie cardiovascolari, dislipidemie, nonché diabete mellito non insulino-dipendente.

L'obesità si sviluppa quale conseguenza di un bilancio energetico positivo derivante da un introito calorico che eccede il dispendio energetico. Un soggetto può, pertanto, diventare obeso se, pur avendo un normale dispendio energetico, l'assunzione calorica è eccessiva o se, pur alimentandosi correttamente, ha un deficit del metabolismo energetico.

L'obesità è un problema assai intricato e dipende da complesse interazioni tra fattori ambientali, comportamentali, culturali che agiscono su un terreno già predisposto da fattori genetici, metabolici e ormonali.

L'influenza dei fattori ambientali è dimostrata dalla concordanza degli indici di massa corporea (BMI) esistente tra gemelli omozigoti rispetto a quelli eterozigoti.

Modelli animali di obesità legata ad alterazione del metabolismo energetico sono i topi *ob/ob* e *db/db*. I primi presentano una mutazione non senso a livello del codone 105 del gene della leptina che determina l'espressione di un mRNA troncato non codificante per la proteina intera (*Zhang, Proenca et al., 1994*). Nei topi *ob/ob* si ha, quindi, un deficit di leptina accompagnato da un'eccessiva espressione costitutiva di NPY: sono topi iperfagici, obesi, sterili che presentano insulino-resistenza e ipotiroidismo (*Collins, Surwit, 1996*). Sono caratterizzati da una condizione di deficienza del segnale leptinico, per ridotti livelli circolanti dell'ormone o per insensibilità al segnale, con conse-

guente aumento dell'appetito, nonché riduzione del dispendio energetico. A livello centrale viene avvertito come inadeguato il livello delle scorte energetiche e di conseguenza sono poste in atto misure finalizzate ad una positivizzazione del bilancio energetico con ricostituzione delle scorte e conseguente aumento del peso corporeo.

Nei topi *db/db*, invece, la mutazione è a livello del gene che codifica per il recettore della leptina. La mutazione di una singola base introduce un nuovo sito di *splicing* che provoca l'inserzione di 106 basi nell'mRNA del recettore (*Lee, Proenca et al., 1996*). La sequenza inserita codifica per la forma corta del recettore e, così, il livello della forma lunga è notevolmente ridotto. Questi topi hanno un fenotipo simile agli *ob/ob*, ma sviluppano una grave iperglicemia con insulinopenia e sono, quindi, diabetici (*Coleman, 1978; Coleman, 1982*).

La scoperta che mutazioni a carico del gene della leptina o del suo recettore siano in grado di provocare obesità nei topi ha fatto ipotizzare l'esistenza di un simile fenomeno anche nell'uomo.

Studi effettuati al fine di identificare soggetti umani obesi con ridotti livelli di mRNAdella leptina hanno dato finora esito negativo (*Hamilton, Paglia et al., 1995; Considine, et al., 1996*), né sono state trovate mutazioni del gene ob correlabili con una situazione di obesità (*Maffei, Stoffel et al. 1996*). Tuttavia, pazienti adulti, sia di sesso maschile che femminile, che mostrano la sostituzione Arg105Trp nel gene della leptina sono obesi e caratterizzati gli uni da uno stato prepuberale, le altre da amenorrea primaria (*Montague, Prins et al., 1996; Strobel, Issad et al., 1998*).

E', tuttavia, manifesto che tutti i modelli di obesità umana studiati sono caratterizzati da iperleptinemia (*Caro, Kolaczynski et al., 1996*), quindi, probabilmente l'obesità umana è dovuta ad una diminuita responsività alla leptina, con un meccanismo simile a quello del diabete di tipo II, caratterizzato da insulino-resistenza e da elevati livelli di insulina. Il meccanismo con cui si esplica questa leptino-resistenza non è ancora stato identificato. Sono state, in ogni caso, formulate diverse ipotesi quali una diminuzione della quota di proteina legante la leptina o del trasporto attraverso la barriera ematoencefalica. La leptino-resistenza potrebbe, peraltro, derivare da una mutazione a livello recettoriale, che impedisce il normale legame dell'ormone, oppure da un difetto nel sistema di trasduzione del segnale, che impedisce alla leptina di esplicare il suo effetto (*Houseknecht, Baile et al., 1998*).

Recentemente una serie di osservazioni sperimentali ha suggerito che nella genesi della resistenza alla leptina possa essere implicato SOCS 3 (*sup - pressor of cytokine signalling* - 3) che è un inibitore del segnale della leptina indotto dalla leptina stessa (*Bjorbaek et al., 1998*).

I glucocorticoidi e l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi che accompagna l'obesità possono contribuire allo sviluppo della leptino-resistenza (*Zakrzewska et al., 1997*).

Va, infine, segnalato che non si sono riscontrate differenze nell'emivita o nell'attività biologica della leptina circolante tra magri e obesi, né la presenza di anticorpi anti-leptina. La capacità di trasporto della leptina attraverso la barriera ematoencefalica è, peraltro, un fattore limitante che vanifica l'ipotesi dell'esistenza di una proporzionalità di effetto rispetto ai livelli circolanti (*Caro et al., 1996*).

Nuove prospettive per il ruolo e il meccanismo d'azione della leptina nell'obesità si aprono con la recente osservazione che la risposta cellulare all'IL-6, una citochina con una struttura correlabile a quella della leptina, risulta essere aumentata quando questa complessa il suo recettore (*Nakashima et al., 1997; Maione et al., 1998*); questo potrebbe spiegare perché la somministrazione di leptina ricombinante non comporta notevoli cambiamenti nei soggetti obesi che hanno elevati livelli di leptina libera.

2.5.3. Leptina e regolazione dell'asse riproduttivo

Un'adeguata assunzione di cibo è fondamentale per la sopravvivenza, ma anche per la riproduzione; esiste, infatti, una stretta correlazione tra il raggiungimento di un determinato peso corporeo, associato ad una determinata massa grassa, e l'inizio della pubertà (*Kennedy et al., 1963; Frisch et al., 1974*).

Il coinvolgimento della leptina nel controllo della riproduzione è stato ipotizzato in seguito all'osservazione che i topi *ob/ob*, *db/db* e i ratti *fa/fa* sono ipogonadici e sterili (*Coleman et al., 1982*). E' stato infatti messo in evidenza che, nella femmina *ob/ob*, le concentrazioni di steroidi sessuali sono basse e la secrezione ipofisaria di gonadotropine depressa. La somministrazione di leptina ripristina la regolare secrezione di gonadotropine e la normale situazione di fertilità (*Chehab et al., 1996*). Nei topi mantenuti a digiuno il trattamento con leptina inverte gli effetti associati con la mancanza di cibo, stimola i livelli di testosterone e LH e, nelle femmine, ripristina il ciclo ovulatorio (*Ahima et al., 1996*). La leptina sembra agire, sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, a livello ipotalamico; infatti, neuroni immortalizzati di ratto LHRH secernenti, esprimono la forma lunga del recettore della leptina (*Zamorano et al., 1997*), e la perfusione di ipotalami isolati con bassi livelli di leptina determina un aumento della secrezione di LHRH (*Yu et al., 1997*). L'effetto della leptina sul rilascio di LHRH è confermato anche dal fatto che nei topi *ob/ob* il rilascio di LHRH è deficitario (*Batt et al., 1982*) ed è normalizzato proprio in seguito a trattamento con leptina; inoltre, la somministrazione di leptina anticipa l'inizio della pubertà, che è sotto il controllo dell'LHRH ipotalamico. In ogni modo, la leptina, in colture di cellule ipofisariche di ratto, bue e maiale, stimola direttamente la secrezione di gonadotropine (*Barb et al., 1997; Liou et al., 1997; Yu et al., 1997*). Le ovaie dei topi *ob/ob*, se trapiantate in femmine non mutate, sono perfettamente funzionanti a conferma che nei topi *ob/ob* la

disfunzione è localizzata non a livello ovarico, bensì a livello ipotalamico (*Friedmann et al., 1991*).

Essendo l'NPY un potente inibitore della secrezione di gonadotropine (*Kalra et al., 1996*), l'effetto della leptina sulla secrezione di LHRH potrebbe essere mediato da quest'ultimo. L'NPY, infatti, inibisce l'impulso stimolatorio che, attraverso vie neuronali discendenti, raggiunge i neuroni LHRH secernenti (*Campfield et al., 1996*) e la leptina, diminuendo l'espressione dell'NPY nell'ARC, rimuove il freno inibitorio sul rilascio dell'LHRH. E' stato, peraltro, dimostrato che il trattamento con leptina in neuroni immortalizzati GT1-7, una linea cellulare di topo che secerne LHRH, ne stimola direttamente il rilascio (*Magni et al., 1999*).

I recettori della leptina sono espressi anche a livello dell'ovaio, dei testicoli (*Schwartz et al., 1996; Zamorano et al., 1997*) e delle cellule della granulosa; l'incubazione, in vitro, di cellule di granulosa di bovino con concentrazioni fisiologiche di leptina riduce il rilascio, indotto dall'insulina, di estradiolo e progesterone. La leptina sembra, quindi, in grado di influenzare direttamente la sintesi e/o il rilascio di steroidi gonadici.

Adeguati livelli di leptina sono fondamentali per l'inizio della pubertà: nei topi la sua somministrazione sottocutanea determina una precoce apertura della vagina e anticipa la comparsa del ciclo ovulatorio (*Cheung et al., 1996*). Probabilmente un aumento dei livelli di leptina nella fase prepuberale agisce da innesco per l'inizio della pubertà. Studi in vivo, condotti su giovani studentesse affette da amenorrea ricorrente, hanno evidenziato che è necessario un livello critico di leptina per assicurare il normale ciclo ovulatorio. La leptina funziona, quindi, da segnale delle riserve energetiche e permette un'adeguata funzionalità dell'asse riproduttivo solo in presenza di opportune scorte energetiche.

2.5.4. Leptina e regolazione assse ipotalamo-ipofisi-surrene

La leptina regola direttamente, nell'uomo, le funzioni surrenaliche, tramite i suoi recettori presenti sulle cellule surrenaliche. La leptina inibisce il rilascio dell'ormone stimolante la corticotropina (CRH) dimostrato *in vitro*, senza effetti sulla proliferazione cellulare; inoltre, i glucocorticoidi, forse per *feedback* a ciclo chiuso permettono un incremento dell'espressione genica del peptide; è dato clinico che i livelli della proteina circolante sono inversamente proporzionali a quelli del cortisolo.

Il sistema endocrino e quello immunitario sono legati da un sistema di comunicazione costituito da citochine e neuropeptidi che interagiscono per modulare la risposta dell'organismo alle infezioni. La perdita di peso e l'anoressia sono frequentemente accompagnati da infezioni probabilmente secondarie al rilascio di citochine dove anche la leptina gioca un suo ruolo.

L'espressione di leptina è stimolata dai glucocorticoidi, endotossine e cito-

chine; la leptina a sua volta inibisce l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). La leptina determina una inibizione dose-dipendente della stimolazione della secrezione del cortisolo nelle cellule surrenaliche normali umane e di ratto in vitro. Questo effetto è mediato dall'isoforma lunga del recettore della leptina, perché il suo trascritto è espresso nel tessuto surrenalico.

2.5.5. Regolazione della sintesi e secrezione di GH e prolattina

L'importante relazione esistente tra composizione corporea, bilancio energetico ed ormone della crescita è ben nota. L'ormone della crescita aumenta in risposta al digiuno nei roditori e diminuisce nell'uomo. D'altro canto, i livelli di IGF-I sono diminuiti dal digiuno in entrambe le specie.

Diversi studi hanno messo in evidenza un ruolo della leptina nella regolazione dell'ormone della crescita: la sintesi e secrezione dell'ormone della crescita è alterata nei roditori e negli uomini in caso di deficienza leptinica o di anormalità del recettore leptinico (C*lement, Vaisse et al., 1998*); il trattamento con leptina previene l'abolizione della sintesi/secrezione dell'ormone della crescita durante il digiuno, l'immunoneutralizzazione della leptina, attraverso iniezione ICV di antisiero per la leptina, diminuisce la secrezione dell'ormone della crescita.

Diversamente da ciò che accade in caso di digiuno, non è tuttora ben chiarito il ruolo della leptina nella regolazione della sintesi e/o secrezione dell'ormone della crescita in condizioni di assunzione di cibo. Infatti, l'iniezione acuta ICV di leptina, così come l'infusione per 3 giorni con tale ormone, non hanno influenzato l'ormone della crescita nei ratti, mentre l'infusione per 7 giorni ne ha diminuito i livelli. E' stato, peraltro, evidenziato che la leptina incrementa l'ormone della crescita in maiali regolarmente nutriti, ma non in pecore (*Barb, Yan et al., 1998*). Le ragioni di queste discrepanze tra le diverse specie non sono ancora state chiarite.

La leptina può regolare l'ormone della crescita attraverso l'inibizione della sintesi e secrezione della somatostatina. La regolazione dell'ormone della crescita da parte della leptina può anche essere mediata dal *growth hormone releasing hormone* (GHRH), come mostrato dalla capacità del siero anti-GHRH di prevenire la stimolazione del rilascio di GH in ratti a digiuno in risposta alla leptina. Inoltre, l'isoforma lunga del recettore della leptina (OB-Rb) è espressa a bassi livelli nell'ipofisi anteriore, facendo ipotizzare un effetto stimolatorio della leptina sull'ormone della crescita nella ghiandola stessa. Si è anche visto che la leptina stimola pulsi secretori di prolattina nei ratti così come la secrezione di prolattina da ghiandole ipofisarie isolate (*Yu, Walczewska et al., 1997*). La stimolazione di prolattina da parte della leptina è bloccata dall'antagonista dei recettori 3 e 4 della melanocortina (MC) SHU9119 e dall'antagonista selettivo del recettore MC4 HS014, evidenziando che il segnale MC può mediare l'interazione tra leptina e prolattina.

2.5.6. Leptina ed ematopoiesi

Numerose citochine e fattori di crescita sono responsabili della proliferazione delle cellule staminali del midollo osseo. L'identificazione dei recettori della leptina nel tessuto ematopoietico, la sua struttura simile a quella delle citochine e la presenza di adipociti come principale tipo di cellule stromali nel midollo osseo, hanno fatto ipotizzare un suo coinvolgimento nell'ematopoiesi. Inoltre, in numerosi campioni di tessuto ematopoietico di topo e ratto, è stata evidenziata la presenza di entrambe le forme, lunga e corta, del recettore della leptina. Il trattamento dei macrofagi peritoneali di topo con leptina aumenta la produzione di citochine e la fagocitosi dei parassiti e studi di transfezione indicano che l'isoforma OB-Rb del recettore stimola la proliferazione delle cellule Ba/F3 e la differenziazione in macrofagi delle cellule M1. La leptina stimola, poi, lo sviluppo delle linee mieloidi ed eritroidi, aumenta il numero di macrofagi e agisce sinergicamente con l'eritropoietina nella stimolazione dell'eritropoiesi.

Inoltre, la leptina è in grado di stimolare, in maniera dose-dipendente, la proliferazione e l'attivazione, in vitro, di monociti umani, inducendo la produzione di citochine quali TNF-α e IL-6.

L'osservazione che i topi *db/db*, che esprimono il recettore troncato della leptina, hanno bassi livelli periferici di alcune popolazioni di linfociti B e T e che il loro midollo è deficitario di alcuni progenitori linfopoietici, sembra confermare il ruolo della leptina nell'ematopoiesi.

2.5.7. Leptina e proliferazione cellulare

Numerosi ligandi in grado di attivare la via di segnale Jak/STAT influenzano la crescita, la proliferazione ed il differenziamento in molti tipi cellulari (*Cattaneo, Fraja et al., 1996*). La scoperta che l'isoforma lunga del recettore della leptina (OB-Rb) sia in grado di interagire con la via Jak-STAT (*Baumann, Morella et al., 1996*) ha fatto ipotizzare un possibile coinvolgimento della leptina nel controllo della crescita e della proliferazione cellulare.

Infatti, l'OB-Rb, in seguito al legame con la leptina, è in grado di generare un segnale proliferativo attivando Jak 2, a livello delle cellule BAF3, una linea cellulare ematopoietica trasfettata appunto con l'isoforma lunga del recettore. Al contrario, le stesse cellule, trasfettate con l'isoforma OB-Ra non sono soggette allo stimolo proliferativo, né all'attivazione di Jak 2.

Il trattamento con leptina causa un aumento significativo e, soprattutto, dose-dipendente della proliferazione delle cellule formanti colonie di leucemia mieloide cronica. A questo livello l'effetto ottimale è stato osservato a concentrazioni plateau di leptina (50-100 ηg/mL), mentre a concentrazioni superiori l'effetto diventava di tipo inibitorio.

Un altro studio ha riscontrato, in vitro, un simile effetto proliferativo dose-dipendente della leptina su monociti circolanti umani che venivano così indotti a produrre ciotochine quali TNF-α e IL-6 (da 0.01 a 10 nM).

E' stato, inoltre, rilevato che la leptina è in grado di aumentare la fosforilazione in tirosina di numerose proteine intracellulari e, di conseguenza, aumentare l'espressione di c-fos. Tutto questo precede un incremento della risposta proliferativa delle cellule RINm5F, una linea cellulare costituita da cellule β-pancreatiche. Sempre a livello di un'altra linea cellulare β-pancreatica, MIN6, è stato riscontrato che la leptina, a concentrazioni fisiologiche, può indurre proliferazione attraverso la cascata della MAPchinasi; si è osservato sia un incremento della forma attivata dell'enzima MAP chinasi che è correlato in particolare all'effetto proliferativo, sia un aumento della fosforilazione di residui tirosinici di STAT1 e STAT3, indicando, quindi, l'attivazione della via Jak-STAT.

La leptina è, peraltro, in grado di stimolare la proliferazione della linea cellulare embrionale murina C3H10T1/2, sempre attraverso la via della MAP chinasi.

I recettori della leptina, sia l'isoforma lunga OB-Rb che quella corta OB-Ra, sono espressi in linee cellulari cancerose di colon e in tessuto di colon umano. La stimolazione di questi provoca fosforilazione della p42/p44 MAP chinasi e induce proliferazione sia in vitro che in vivo.

In alcuni casi, però, la leptina può agire in senso antiproliferativo: infatti, inibisce la crescita delle linee cellulari ipofisarie: umana HP75 e di ratto GH3. Va osservato al riguardo che sia l'RNA messaggero che la proteina del recettore della leptina sono normalmente espressi nelle cellule ipofisarie, sia normali che neoplastiche.

2.5.8. Leptina e dimorfismo sessuale

La relazione tra massa grassa e concentrazioni plasmatiche di leptina è significativamente condizionata dal sesso e, nelle donne, dallo stato fisiologico di pre o post menopausa. Le concentrazioni plasmatiche di leptina sono significativamente più alte nelle donne rispetto agli uomini; inoltre, tra le donne, si registrano livelli di leptina maggiori in età fertile rispetto ad una condizione di menopausa. Quest'ordine di cose per ciò che riguarda i livelli plasmatici di leptina (donne in pre-menopausa>donne in post-menopausa>uomini) si mantiene anche quando questi ultimi vengono corretti per la massa grassa e per altri indici di massa corporea (come il BMI), cosa che esclude la possibilità che le maggiori concentrazioni plasmatiche di leptina nelle donne siano dovute al fatto che esse possiedono meno massa magra, un minor volume plasmatico e/o una ridotta *clearence* della leptina rispetto agli uomini. Gli stessi autori affermano inoltre che le equazioni di regressione che mettono in relazione la massa grassa con le concentrazioni corporee di leptina non differiscono significativamente a seconda che si considerino soggetti magri piuttosto che obesi. Questo suggerisce che l'obesità umana non è il

risultato di un difetto di produzione di leptina perché, se così fosse, i soggetti obesi dovrebbero avere un rapporto "concentrazione corporea di leptina/massa grassa" significativamente più basso rispetto a soggetti magri. Se l'obesità umana fosse effettivamente dovuta ad un meccanismo di resistenza nei confronti delle azioni della leptina, si dovrebbero riscontrare livelli plasmatici di leptina significativamente maggiori negli obesi rispetto ai normopeso; effettivamente molti studi hanno riportato, per esempio, una maggiore espressione di mRNA codificante per la leptina negli adipociti prelevati da soggetti obesi rispetto a quelli provenienti da soggetti magri.

Avendo le donne livelli circolanti di leptina più elevati rispetto agli uomini (a parità di massa grassa), si può pensare che esista un dimorfismo sessuale nella produzione proteica o nella velocità di eliminazione della leptina stessa. Inoltre, dal momento che le donne in menopausa hanno minori quantità di leptina plasmatica normalizzate rispetto alla massa grassa, si può ragionevolmente supporre che le concentrazioni plasmatiche di leptina vengono probabilmente aumentate dagli estrogeni e/o dal progesterone. Nelle donne in menopausa, tuttavia, le concentrazioni corporee di leptina normalizzate per la massa grassa restano significativamente più alte che negli uomini; questo significa che, con ogni probabilità, anche gli androgeni hanno un effetto, questa volta soppressivo, sui livelli plasmatici di leptina.

2.5.9. Leptina nella pubertà

Il topo *ob/ob* e con deficit di leptina (*Zhang Y et al., 1994*) mostra un'immaturità riproduttiva marcata in entrambi i sessi, con peso uterino e delle gonadi ridotto, numero follicolare basso così come i livelli di gonadotropine (*Barash et al., 1996*). Tutti questi parametri sono corretti dalla somministrazione di leptina in topi *ob* maschi e femmine (*Ahima et al., 1996*). Inoltre, il trattamento con leptina di topi normali, giovani e femmine ha mostrato di accelerare l'inizio della pubertà (*Ahima et al., 1997*). Quindi, la leptina sembra agire come un fattore che permette e dà inizio alla pubertà. Dall'altro lato, è, tuttavia, difficile collegare i complessi meccanismi della pubertà con modificazioni dei singoli segnali putativi quali la leptina. È ampiamente riconosciuto che la limitazione di cibo ritarda l'inizio della pubertà, mentre la rialimentazione elimina questo ritardo (*Cameron et al., 1996*). Inoltre, da modelli umani e murini, riguardanti la mancanza di leptina su base genetica, si è osservato che questi non riescono ad entrare nella pubertà, ma trattamenti con leptina possono ristabilire un modello secretorio pulsatile di gonadotropine che è caratteristico della pubertà precoce (*Hoggard et al., 1997*). Al contrario, il topo magro transgenico femmina, che è un modello di iperleptinemia cronica in assenza di tessuto adiposo, entra nella pubertà precocemente. I dati riguardanti gli effetti della somministrazione della leptina all'inizio della pubertà sono controversi, infatti è stato mostrato che la somministrazione di leptina intracerebroventricolare previene il ritardo nell'apertura

della vagina indotto, invece, da una restrizione cronica di cibo nel ratto. Al contrario, è stato scoperto che livelli di leptina aumentati artificialmente non sono sufficienti per sopperire il ritardo dell'inizio della pubertà causato dalla privazione di cibo.

La frequenza delle mutazioni disattivanti del gene della leptina, come osservato nel topo *ob*, è, nell'uomo, molto rara; tuttavia, i pochi casi riportati confermano che la leptina gioca un ruolo importante collegando adiposità e riproduzione. In particolare, pazienti adulti femmine e maschi con la sostituzione del Arg105Trp nel gene della leptina sono obesi e rispettivamente caratterizzati da amenorrea primaria e stato prepuberale (*Montague, Prins et al., 1996; Strobel, Issad et al., 1998*).

Questa osservazione sostiene anche il concetto secondo il quale la leptina non è soltanto un fattore che permette la funzione riproduttiva nell'adulto, ma può anche rappresentare una barriera metabolica per l'inizio della pubertà suggerita dall'aumento peripuberale dei livelli plasmatici dell'ormone in entrambi i sessi (*Cheung et al., 1997*). Alcuni studi mostrano che l'età ha un effetto significativo sulle concentrazioni seriche di leptina attraverso la prepubertà sino alla pubertà precoce. Nei maschi, i livelli di leptina si alzano durante l'infanzia, raggiungono il picco nelle prime fasi della pubertà e poi diminuiscono, mentre nelle femmine aumentano stabilmente durante lo sviluppo puberale, indipendentemente dal loro indice di massa corporea (*Oslund et al., 1996*). Di conseguenza, i livelli di leptina sono 3/4 volte più alti nelle donne rispetto agli uomini.

Blum e collaboratori (1997), partendo dal presupposto che l'infanzia e la pubertà sono periodi di maggior cambiamento metabolico ed endocrino, hanno studiato in 713 bambini e adolescenti sani - 312 maschi e 401 femmine - diversi parametri, quali i livelli di leptina, IGFI, IGFII, IGFBP1,2,3, estradiolo, testosterone DHEAS e SHBG. I livelli di leptina aumentavano nelle femmine dopo i 12 anni, mentre nei maschi diminuivano con l'avanzare dell'età. Sia maschi che femmine avevano un incremento significativo del BMI con l'età e lo sviluppo puberale: livelli di leptina, al contrario, aumentavano con la pubertà nelle femmine, mentre diminuivano nei maschi nonostante un aumento del BMI. Era evidente una forte relazione esponenziale fra i livelli di leptina e BMI nelle femmine, mentre questa relazione era più debole nei maschi. I livelli di leptina sono stati messi in relazione con il BMI, l'età e lo stadio di sviluppo puberale secondo Tanner (*Tanner et al., 1983*). Si è visto che nei maschi i livelli di leptina ed il BMI erano paragonabili negli stadi 1 e 2 di Tanner, mentre, con il progredire della pubertà, negli stadi 3, 4, 5 i livelli di leptina diminuivano. Diversamente, le differenze tra i livelli di leptina nei maschi e nelle femmine, in relazione al BMI e l'età, erano meno evidenti nella primissima e prima pubertà rispetto allo stadio 5 di Tanner. In questo studio, oltre al BMI e all'età, solo il testosterone, il volume testicolare - inversamen-

te correlati - l'estradiolo - direttamente correlato - sono risultati contribuire significativamente alla variazione dei livelli di leptina portando ad ipotizzare che gli androgeni determinano indirettamente un aumento del tessuto muscolare con diminuzione del tessuto adiposo e, quindi, diminuzione dei livelli plasmatici di leptina (*Blum et al., 1997*). Queste ipotesi sono sostenute anche da studi in vitro che mostrano che androgeni e estrogeni inibiscono e stimolano rispettivamente l'espressione ed il rilascio di leptina dagli adipociti umani in cultura (*Wabitsch et al., 1997; Wauters et al., 2000*). Quindi, il dimorfismo sessuale della secrezione di leptina inizia con la maturazione puberale.

2.5.10. Leptina e angiogenesi

Diversi studi sperimentali in vivo ed in vitro hanno dimostrato come la leptina sia un fattore stimolante angiogenesi. Il gruppo di Sierra-Honigmann ha evidenziato nell'endotelio vascolare umano l'espressione del recettore per la leptina Ob-Rb e ha dimostrato che tale recettore è funzionalmente competente all'attivazione della via di segnale intracellulare Jak-STAT3.

In vivo, la correlazione tra leptina ed angiogenesi è stata confermata dallo studio comparato dell'induzione di neovascolarizzazione nelle cornee di ratti normali, rispetto al mancato evento nelle cornee di *fa/fa* ratti Zucker, con deficit per i recettori della leptina.

Studi in vitro sullo stesso modello cellulare dello studio precedente (HUVECs, *human umbilical venous endothelial cells*) hanno confermato la presenza sia del recettore OB-Rb che della isoforma Ob-Ra e hanno dimostrato una attivazione leptina dipendente della via di segnale delle MAP kinasi p42/p44. Questa via di segnale è correlata alla mitogenesi, ed ulteriori esperimenti hanno evidenziato un aumento di proliferazione delle cellule endoteliali, il cui effetto massimo cadeva in corrispondenza di una concentrazione di leptina plasmatica fisiologica (10 ng/mL). Tale concentrazione è paragonabile a quella del fattore proangiogenico per eccellenza, *vascular endotelial growth factor* (VEGF), che provoca un analogo aumento della proliferazione delle cellule endoteliali.

Lo studio di Park ha evidenziato che la leptina (10/40 ng/mL) induce proliferazione e un aumento dose-dipendente di metalloproteinasi della matrice (MMP-2; MMP-9) e di inibitori tessutali delle metallo proteinasi (TIMP- 1; TIMP-2) sui modelli cellulari HUVECs e HCASMCs (*human coro - nary artery smooth muscle cells*), indicando che la leptina può avere un importante ruolo nel rimodellamento della matrice regolando l'espressione di metalloproteinasi e di inibitori delle stesse.

Tutte queste prove circa l'attività angiogenetica della leptina hanno dato avvio a speculazioni riguardanti un possibile ruolo integrato della leptina quale fattore *cross-talk* tra spesa energetica e vasculogenesi, tra adipogenesi e vasculogenesi e tra promozione tumorale e vasculogenesi.

2.5.11. Leptina e sindromi genetiche

L'obesità è un disordine dovuto al bilancio energetico, che indica un disequilibrio cronico tra apporto alimentare e spesa energetica. Parecchie sindromi genetiche includono l'obesità tra le loro caratteristiche cliniche. Una delle più diffuse è la Sindrome di Down (trisomia 21) e, sebbene non sia molto chiara l'eziologia dell'obesità in questa sindrome, è stata attribuita ad una aumentata incidenza di ipotiroidismo ed altri disordini metabolici associati alla stessa. Chumlea e Cronk suggerirono che il sovrappeso è una caratteristica della trisomia 21 dai 2 ai 3 anni di età sino all'adolescenza (*Chumlea et al., 1981*).

Un'altra forma comune di obesità congenita umana è la Sindrome di Prader-Willi caratterizzata da un disordine congenito multi-sistemico complesso dovuto a delezione interstiziale, di derivazione paterna, del cromosoma 15q 11-13, o a disomia uniparentale materna - due coppie materne di 15q (*Holm et al., 1993*). Parametri biologici e clinici suggeriscono che questa sindrome è dovuta ad un disordine ipotalamico; è, quindi, possibile presumere che l'obesità nei pazienti Prader-Willi sia il risultato di deficienze ipotalamiche che coinvolgono i prodotti di uno o più geni che si trovano in questa regione del cromosoma 15. Uno studio recente (*Cento et al., 1999*) condotto su 16 donne obese - 8 con Sindrome di Down e 8 con Sindrome di Prader-Willi - ha mostrato una correlazione significativa tra i livelli sierici di leptina e il BMI nei pazienti analizzati, simile a quella riscontrabile in pazienti obesi normali (*Maffei et al., 1995; Considine et al., 1996*). Tuttavia, quelli con Sindrome di Down presentavano valori di leptina più bassi rispetto a quelli con Sindrome di Prader-Willi, ma sovrapponibili ai controlli magri (14.6 ± 3.7 ng/mL), mentre nessuna differenza è stata osservata tra la Sindrome di Prader-Willi e i soggetti controllo obesi (35.0 ± 9.3 ng/mL). Ciò ha portato ad ipotizzare che nei soggetti con Sindrome di Down vi sia un'attività secretoria alterata degli adipociti o un danno al sistema di connessione tra i meccanismi centrale e gli adipociti. Così, è possibile suggerire che il cromosoma 21 potrebbe essere correlato in modo diverso nella regolazione della secrezione della leptina.

3. Leptina plasmatica: forma libera e forma legata

Recentemente un gruppo di ricercatori della Thomas Jefferson University ha dimostrato con convincenti prove, mediante l'utilizzo di una tecnica cromatografica di gel-filtrazione, la presenza nella circolazione sistemica di una "leptina libera" (circolante in forma monomerica) e di una "leptina legata" (circolante sotto forma di un complesso di maggiore peso molecolare con proteine plasmatiche di trasporto).

Attualmente la natura delle macromolecole che complessano la leptina e il ruolo che tali proteine svolgono nel modulare la biodisponibilità sono poco conosciute come, quindi, l'attività della leptina stessa. Conseguentemente studi sempre più numerosi sono oggi volti a valutare, non solo la natura di queste *binding proteins*, ma anche come varia il rapporto tra le quantità relative delle due forme circolanti di leptina, libera e legata, sia in condizioni fisiologiche che patologiche; variazioni di tale rapporto possono, infatti, riflettere un diverso ruolo, nonché una differente regolazione delle due forme.

L'affinità cromatografica ha rivelato che queste proteine di trasporto hanno un peso molecolare compreso tra 40 kDa e 280 kDa. Studi eseguiti con anticorpi monoclonali diretti contro la parte extracellulare del dominio di legame del recettore della leptina suggeriscono che circa il 10% delle proteine di legame potrebbe essere costituito dalla forma solubile del recettore della leptina.

3.1. Rilevamento della leptina plasmatica libera e legata: metodiche a confronto

Varie metodiche sono state sviluppate per il rilevamento della forma libera e legata della leptina; tra queste compare la gel-filtrazione con una resina del tipo Sephadex G-100, adottata sia da Sinha che da Teppa.

Un altro metodo utilizzato per quantificare la leptina libera e legata è basato sulla separazione cromatografica con HPLC, seguita da una analisi RIA delle frazioni ottenute. L'aggiunta di leptina esogena ai campioni già separati consente, inoltre, di valutare direttamente la capacità legante della leptina, in base alla competizione che si stabilisce tra la leptina sierica e quella esogena (*Landt, 2000*).

Eichler et al. 1999 indicano che un'alternativa alla cromatografia di esclusione per la determinazione della capacità legante della leptina potrebbe essere rappresentata dalla SPC (*spun-column assay*); i risultati ottenuti con le due metodiche sembrano, infatti, essere altamente correlati.

Un'altra alternativa alla tradizionale cromatografia per la separazione

della leptina libera e legata è rappresentata dalla AEE (*acid-ethanol extraction*); in particolare tale metodica è stata utilizzata per valutare se la diminuzione della sensibilità alla leptina, mostrata nei ratti con l'incremento dell'età, è secondaria ad una eventuale alterazione della capacità legante della leptina stessa. In particolare la concentrazione sierica di leptina libera aumenta significativamente nei ratti di 24 mesi rispetto a quelli di 18 mesi, aventi simile peso e massa adiposa. Questo suggerisce che l'invecchiamento nei ratti è associato ad un'insensibilità nei confronti della leptina, che non può essere però attribuita con certezza ad un aumento della capacità legante o ad una riduzione della frazione libera dell'ormone.

La separazione della forma libera e legata è stata infine ottenuta anche da Brabant, mediante l'ausilio di uno specifico *radioimmunoassay*.

3.2. Leptina libera e legata: ipotesi su un loro differente ruolo fisiologico

Studi effettuati con l'ausilio della gel cromatografia, mostrano una diversa distribuzione della leptina libera e legata nei soggetti obesi rispetto ai relativi controlli normopeso. Infatti, vi è un'elevata percentuale di leptina legata (46.5 ± 6.6%) in soggetti magri rispetto agli obesi (21.4 ± 3.4%); inoltre, gli effetti del digiuno sui livelli di leptina libera sono più pronunciati nei primi (basale vs. digiuno di 24h: 19.6 ± 1.9% vs. 1.3 ± 0.4% ng / mL) rispetto ai secondi (basale vs. digiuno di 24h: 28.3 ± 9.8% vs. 14.7 ± 5.3% ng / mL); non è stata, invece, osservata una significativa diminuzione dei livelli di leptina legata in entrambi i gruppi. Questi dati suggeriscono che, nei casi di obesità, la maggior parte della leptina circola nella forma libera, presumibilmente la forma bioattiva, e che questi soggetti dimostrano una resistenza alla leptina libera.

Nei soggetti magri, invece, la leptina sierica è principalmente presente nella forma legata, e quindi probabilmente non è in grado di raggiungere i recettori centrali per esplicare la sua azione inibitoria sull'assunzione di cibo, sia in condizioni normali che a digiuno.

Entrambe le tipologie di soggetti, ovvero magri ed obesi, mostrano una positiva correlazione tra il BMI e i livelli di leptina sia libera che legata; una restrizione dietetica negli obesi comporta una riduzione della concentrazione sierica di entrambe le forme.

Un'altra categoria di pazienti presa in considerazione in questo genere di studi è rappresentata da soggetti ipertiroidei in cui la correzione dello stato di tireotossicosi comporta un aumento significativo solo della concentrazione sierica di leptina libera, parallelamente all'aumento di peso corporeo e di massa grassa registrati; contrariamente, diminuiscono in tali soggetti i livelli sierici di leptina legata.

Inoltre, sembra esistere una correlazione positiva tra il decremento dei livelli di leptina legata e la diminuzione della spesa energetica basale (*resting energy expenditure*, REE); questi dati suggeriscono che, mentre i livelli di leptina libera sono strettamente dipendenti dalla percentuale di massa grassa, la leptina legata è correlata alla spesa energetica, indipendentemente dalla massa grassa.

A sostegno di tale ipotesi, è stato riscontrato che la somministrazione di leptina ricombinante a bambini leptino-deficienti comporta una diminuzione del peso corporeo, riducendo l'apporto calorico, ma senza una apparente modificazione della spesa energetica; per ottenere la stessa risposta in soggetti normali o obesi non leptino-deficienti sono, però, necessarie dosi molto più elevate, sovrafisiologiche, di leptina ricombinante.

La recente osservazione che la risposta cellulare all'IL-6, una citochina strutturalmente correlata alla leptina, risulta essere incrementata quando questa complessa il suo recettore (*Nakashima et al., 1997; Maione et al., 1998*), ha suggerito che un simile meccanismo possa ritenersi valido anche per la leptina; questo potrebbe spiegare perché somministrazioni di leptina ricombinante non comportano notevoli cambiamenti nei soggetti obesi che hanno elevati livelli di leptina libera.

Per avere ulteriori informazioni sul distinto ruolo della leptina libera e legata, si sono misurate le concentrazioni sieriche di entrambe, rapportandole alle concentrazioni trovate nel fluido cerebrospinale (CSF) di pazienti con disturbi neurologici di diversa natura.

In questo tipo di studio si è rilevato che un aumento della concentrazione sierica di leptina libera comporta solo un piccolo incremento dei livelli di leptina libera nel CSF; diversamente, vi è una forte correlazione tra leptina legata sierica e cerebrospinale per tutti i *range* di concentrazione osservati, sia in soggetti magri che obesi.

Tale osservazione indica che solo la leptina libera viene trasportata nel fluido cerebrospinale con un sistema di trasporto ad alta affinità, ma a bassa capacità, ovvero saturabile con piccole concentrazioni; questo rappresenta un'altra conferma dell'ipotesi che vuole un diverso ruolo fisiologico delle due forme della leptina.

L'insulina e i glucocorticoidi aumentano i livelli sierici di leptina; alcuni studi mostrano che tale incremento concerne la forma libera della leptina, mentre non sono stati registrati cambiamenti né della leptina legata né della concentrazione del suo recettore solubile. Anche la variazione del rapporto tra leptina libera e legata durante il corso della gravidanza (in particolare, si registra un aumento della concentrazione della forma legata durante l'ultimo trimestre), può riflettere un diverso ruolo fisiologico dei due componenti in questione.

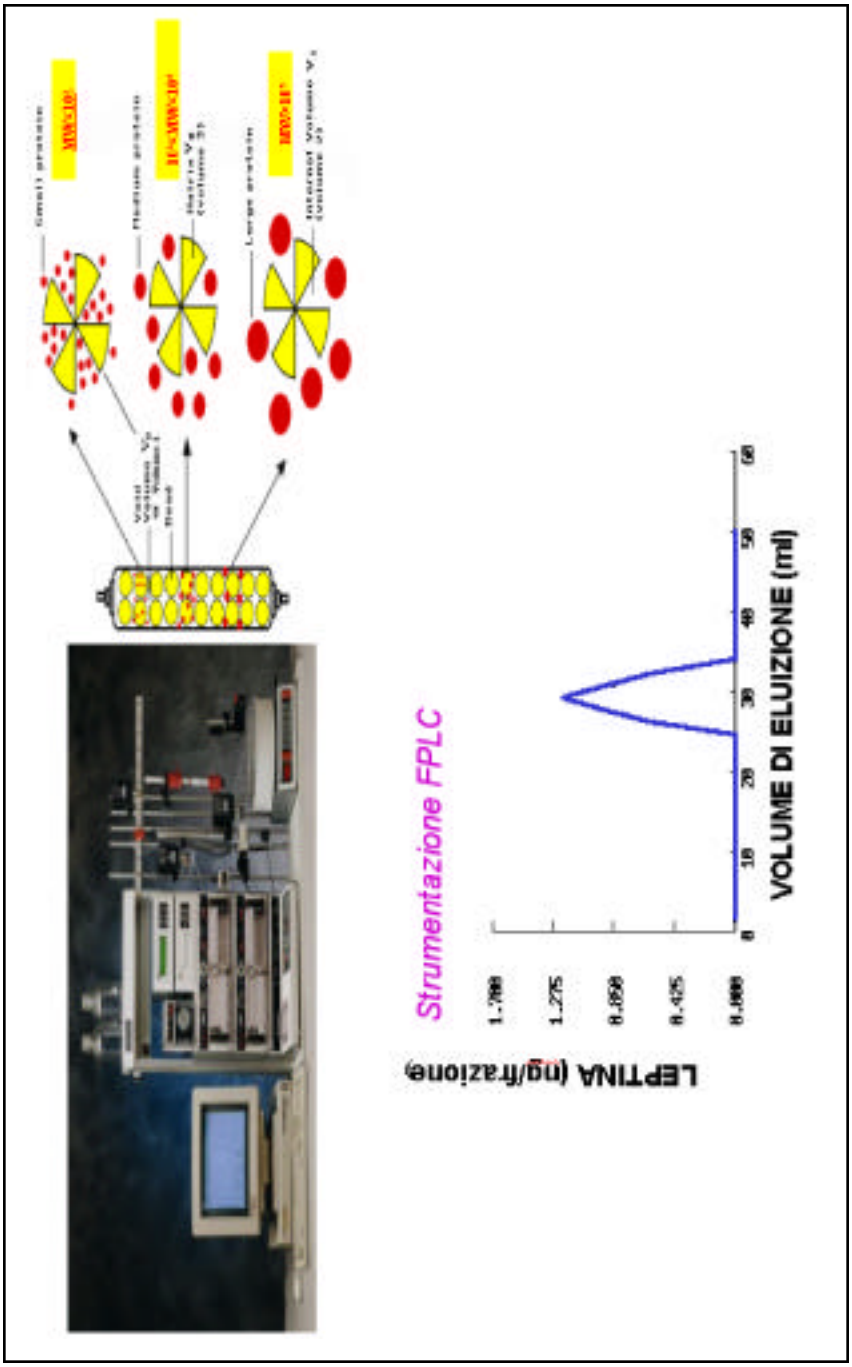


Figura 4. Picco della leptina ricombinante umana.

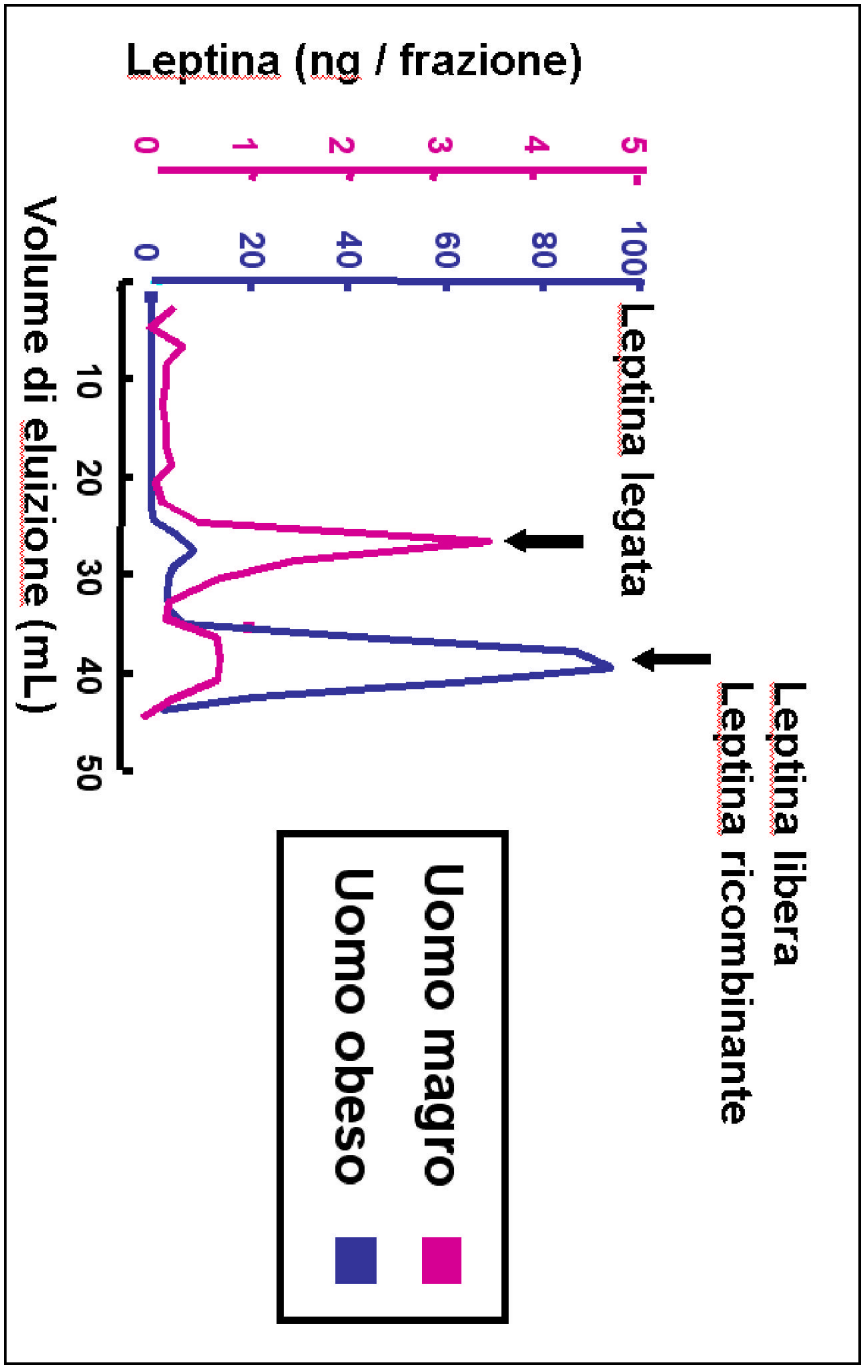


Figura 5. Profili di eluizione della leptina (analisi FPLC).

4. Leptina e tiroide

Attualmente i dati esistenti sulla possibile correlazione tra ormoni tiroidei e leptina sono contrastanti; sono stati, infatti, compiuti studi volti a dimostrare l'influenza della leptina sull'asse ipotalamico-ipofisarico-tiroideo, altri tesi a valutare l'effetto degli ormoni tiroidei sui livelli sierici di leptina, altri ancora dimostranti la reciproca influenza dei due sistemi o, paradossalmente, la completa assenza di correlazioni tra i due ormoni. A complicare tale quadro, si aggiungono le discrepanze riscontrate negli studi in vitro ed in vivo, oltre naturalmente alle differenze rilevate nella popolazione umana e nelle diverse specie animali.

4.1. Correlazioni leptina-asse HPT in animali da esperimento

Studi effettuati su animali sottoposti a digiuno e sui topi *ob/ob*, caratterizzati da deficit assoluto di leptina, sono in favore dell'ipotesi che la leptina regoli positivamente i livelli di ormoni tiroidei. Il digiuno prolungato ha, infatti, un profondo effetto inibitorio sui livelli di leptina, che probabilmente comporta a sua volta una serie di risposte neuroendocrine dell'organismo alla fame, inclusi l'inibizione dell'asse riproduttivo, una diminuzione dei livelli di ormoni tiroidei ed un aumento dei livelli degli ormoni dello stress (*Ahima et al., 1996*); digiuno prolungato e perdita di peso comportano, quindi, bassi livelli sierici di triiodotironina (T3), tiroxina (T4), triiodotironina libera (fT3) e tiroxina libera (fT4) e paradossalmente bassi o normali livelli di TSH (ormone stimolante la tiroide). Nei ratti il digiuno porta anche ad una diminuzione dell'espressione di TRH nel nucleo paraventricolare ipotalamico, nonché ad una diminuzione dei livelli di TRH nel sistema portale-ipotalamo-ipofisarico. L'iniezione di leptina in tali animali comporta una normalizzazione dei livelli circolanti degli ormoni tiroidei e previene la soppressione dei livelli di mRNAdel proTRH (*Ahima et al., 1996*).

La maggior parte degli studi condotti sui topi *ob/ob* mostra bassi livelli circolanti di ormoni tiroidei. Queste osservazioni concordano nell'ammettere una regolazione positiva esercitata dalla leptina sull'asse ipotalamico-ipofisarico-tiroideo (HPT). Inoltre, dal momento che la leptina sembra sopprimere direttamente la produzione di glucocorticoidi nelle ghiandole surrenali, è stato ipotizzato un effetto indiretto della leptina sull'asse HPT; è stato, infatti, osservato che i bassi livelli di leptina durante il digiuno prolungato si associano ad alti livelli plasmatici di corticosterone, che ha, a sua volta, un

effetto inibitorio sui livelli dell'mRNA del pro-TRH. A conferma di ciò, vi è l'osservazione che la riduzione dei livelli dell'mRNA del pro-TRH nel PVN nei ratti a digiuno può essere contrastata se l'aumento dei livelli di corticosterone è impedito da una surrenalectomia.

L'effetto tiromimetico della leptina potrebbe essere mediato, inoltre, dal neuropeptide Y (NPY): la diminuzione della produzione di NPY, in risposta alla leptina, pare, infatti, aumentare l'espressione del TRH.

Infine, uno studio recente ha suggerito che potrebbe esistere una via indiretta. L'ablazione chimica con glutammato monosodico dei nuclei arcuati di ratto, ha evidenziato che l'inanizione - decadimento organico causato da insufficiente apporto calorico alimentare - non è in grado di deprimere i livelli degli ormoni tiroidei. Poiché il trattamento usato lascia i neuroni TRH del Nucleo-Para-Ventricolare (PVN), questo dato suggerisce che la leptina regola l'*input* dall'arcuato ai neuroni TRH nel PVN. Quest'ultima ipotesi è supportata dal fatto che altri autori hanno usato in vivo e in vitro approcci per rilevare il ruolo della via della melanocortina nella mediazione della risposta nutrizionale del neurone TRH alla leptina. La via della melanocortina comprende due ligandi, espressi in popolazioni neurali distinte, nei nuclei arcuati dell'ipotalamo, così come un recettore su cui questi ligandi convergono antagonizzando i reciproci effetti.

I ligandi sono AgRP - soppresso dalla leptina - e α-MSH - indotto dalla leptina. Il recettore 4 per la melanocortina (MC4R) è stimolato da quest'ultimo, ma inibito dal precedente, perciò la via può essere antagonizzata da una diminuzione dell'agonista α-MSH, da un aumento dell'antagonista AgRP o da una perdita nella funzione del recettore. Qualsiasi di questi eventi causa obesità. I dati ottenuti nei suddetti studi suggeriscono che la via della melanocortina gioca un ruolo importante nella regolazione dell'asse della tiroide anche attraverso la leptina, forse promuovendo dei contatti fra i neuroni antagonisti regolati dalla leptina nei nuclei arcuati e neuroni TRH nel PVN.

Meno chiaro è, invece, l'effetto esercitato dagli ormoni tiroidei sulla secrezione di leptina. Alcuni studi dimostrano che nel ratto l'ipotiroidismo conseguente ad una tiroidectomia porta ad un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA della leptina negli adipociti e che tale incremento viene meno con la somministrazione di ormoni tiroidei.

In ratti, resi ipertiroidei dal trattamento con TRH o tiroxina, invece, non si sono riscontrati significativi cambiamenti nei livelli sierici di leptina rispetto ai controlli eutiroidei. Studi in vitro portano, invece, ad osservare un effetto stimolatorio del T3 sulla espressione e sulla secrezione di leptina negli adipociti. Ancora più discordanti sono, attualmente, i risultati degli studi intrapresi nel tentativo di chiarire il ruolo della leptina nella regolazione dell'asse HPT sulla popolazione umana.

4.2. Correlazioni leptina-asse HPT nella popolazione umana

I soggetti con disturbi della tiroide hanno in genere delle alterazioni nel peso corporeo, nell'assunzione di cibo e nella termogenesi; in particolare un'elevata percentuale di pazienti ipertiroidei mostra una diminuzione del peso corporeo, un aumento dell'appetito e della termogenesi, mentre gli ipotiroidei presentano un quadro clinico opposto.

Il peso corporeo è, in realtà, regolato da una molteplicità di fattori, inclusa la leptina, a sua volta implicata nei meccanismi di decremento dell'appetito ed aumento della termogenesi.

Studi recenti indicano che pazienti con una mutazione del recettore della leptina presentano un ipotiroidismo di origine ipotalamica con bassi livelli plasmatici di fT4, livelli normali di TSH e con una risposta ritardata del TSH alla stimolazione del TRH (*Clement et al., 1998*). In base ai risultati ottenuti nella sperimentazione animale, si potrebbe supporre che i pazienti obesi, che presentano elevati livelli di leptina, presentino anche elevati livelli di TSH. Sebbene sia stata trovata una correlazione tra la percentuale di massa grassa e i livelli di TSH, non si può affermare con certezza che vi siano differenze significative tra i livelli di TSH nei pazienti normali rispetto ai controlli.

In alcuni studi condotti su pazienti ipotiroidei, sono stati evidenziati bassi livelli di leptina se rapportati ai controlli eutiroidei, con un incremento dopo trattamento con T4 suggerendo probabilmente come gli ormoni tiroidei siano necessari per la normale espressione e/o sintesi della leptina. In altri invece non è stata riscontrata alcuna differenza sostanziale tra i due gruppi. Infine, Pinkney (1998) e Leonhardt (1998) hanno riscontrato un incremento dei livelli di leptina nei pazienti ipotiroidei.

Uno studio condotto su un gruppo (n=35) di bambini (15 maschi e 20 femmine) con età compresa tra 2-5 anni, ha mostrato livelli plasmatici di leptina non correlanti significativamente con i valori sierici di tiroxina (T4) o fT4; in un secondo gruppo (n=16) di bambini con età compresa tra 8-11 anni invece, le concentrazioni di leptina sieriche correlavano seguendo una logica statistica con le concentrazioni sieriche di T4, ma non con quelle di TSH o fT4.

I dati riguardanti i pazienti ipertiroidei non mostrano significative differenze nei livelli di leptina rispetto ai controlli e il trattamento farmacologico di tali pazienti con farmaci antitiroidei non sembra influenzare la concentrazione sierica di leptina.

In conclusione, quindi, i rapporti tra i livelli plasmatici di leptina e quelli di ormoni tiroidei e TSH rimangono non univocamente chiariti per quanto riguarda la specie umana.

5. Determinazione dei livelli plasmatici di leptina

EIA

La concentrazione plasmatica di leptina è stata dosata usando il Kit Assay Designs, Inc. per determinazioni quantitative della leptina umana nei fluidi biologici (sensibilità, 25,5 pg/mL) che contiene un anticorpo policlonale per immobilizzare la leptina sui pozzetti della piastra da microtitolazione. Dopo una breve incubazione - 1h a 37 °C, l'eccesso di campione è lavato ed è aggiunto un anticorpo policlonale per la leptina, marcato con l'enzima perossidasi di rafano, che si lega alla leptina immobilizzata sul singolo pozzetto. Dopo un ulteriore periodo di incubazione - 1h a 37 °C, l'eccesso di anticorpo marcato viene lavato e si aggiunge il substrato che reagisce con l'enzima perossidasi. Il colore che si genera durante l'incubazione - 30 min. a 25 °C, al buio - viene letto ad una λ di 450 nm ed è direttamente proporzionale alla concentrazione di leptina nel campione.

RIA

La concentrazione plasmatica di leptina è stata misurata usando un metodo RIA per leptina umana (fornito dalla Linco Research Inc, Usa); campioni plasmatici di 100 µl - in duplicato - sono stati incubati una notte con anticorpi marcati della leptina. Il giorno dopo la frazione legata è stata contata dopo precipitazione. La curva standard è stata estesa in basso allo scopo di aumentare il limite inferiore di sensibilità fino ad un valore di 0.025 ng/mLcon coefficiente di variazione < 8.7%.

5.1. FPLC: una tecnica cromatografica basata sul principio di esclusione molecolare

La metodica FPLC (*Fast Protein Liquid Chromathography*) da noi utilizzata è stata sfruttata per la separazione, mediante il principio dell'esclusione molecolare, della frazione di leptina libera (PM=16 kDa) da quella legata (PM=116 kDa) presenti nel plasma dei soggetti in esame. La cromatografia ad esclusione molecolare, detta anche comunemente cromatografia mediante filtrazione su gel o gel-permeazione, è ampiamente utilizzata in biochimica per separare e isolare molecole ad elevato peso molecolare quali le proteine. La ripartizione delle molecole del campione di plasma in esame tra fase mobile e fase stazionaria avviene, quindi, in base alla dimensione delle molecole stesse.

Per valutare l'idoneità della resina scelta, si è analizzato preventivamente un campione di leptina umana sintetica: il volume di eluizione del picco corrisponde a quello della leptina libera trovato nei soggetti esaminati, men-

tre l'ampiezza della banda ottenuta è rappresentativa della efficienza della separazione cromatografica.

Un'aliquota (1,5 mL) di plasma dei soggetti in esame è stata cromatografata utilizzando come fase mobile una soluzione 25mM di *phosphate buffered saline* (pH 7.4), e come fase stazionaria la *Sephacryl S-100* High Resolution, resina costituita da sferule di allil destrano, aventi un range di frazionamento compreso tra 10^3 e 10^5 Dalton. Per ogni aliquota di plasma non ancora frazionata mediante FPLC è stato determinato il contenuto di leptina plasmatica totale (libera + legata) mediante dosaggio radioimmunologico (RIA) utilizzando un apposito kit.

Per evitare che impurità come, ad esempio, i lipidi plasmatici deteriorino la colonna di lavoro, il campione di plasma da frazionare (1ml) viene inizialmente centrifugato per cinque minuti ad una velocità di 5000 rpm e poi filtrato con un filtro da 0.45 µm.

Una volta purificato, il campione di plasma viene caricato nell'iniettore (MV7) e trascinato nella colonna dalla fase mobile (PBS). La velocità del flusso (1ml/min) viene mantenuta costante dalla pompa P-500. Il campione viene fatto, quindi, percolare lungo la colonna cromatografica.

Le molecole proteiche più grandi aventi un peso molecolare maggiore del limite di esclusione (10^5 Dalton), categoria di cui fa parte anche la leptina legata, non vengono trattenute all'interno delle sferule di fase stazionaria e percorrono la colonna con la stessa velocità dell'eluente, attraversando gli interspazi tra le particelle del gel. Le molecole più piccole, come la leptina libera, invece, subiscono un ritardo tanto maggiore quanto minore sono le loro dimensioni e, quindi, la loro capacità di permeare profondamente all'interno dei pori presenti sulle particelle di fase stazionaria. La leptina legata viene, pertanto, eluita prima della leptina libera.

L'eluato in uscita dalla colonna passa attraverso un misuratore di assorbanza (uno spettrofotometro UV), il cui segnale viene convertito su carta da un registratore, e finisce il suo percorso in un raccoglitore di frazioni, che cambia automaticamente provetta quando è stato raccolto il volume prestabilito (1.5 ml). Le provette con il loro contenuto vengono, infine, liofilizzate. Per ogni provetta viene poi determinato il quantitativo contenuto di leptina (libera o legata che sia) mediante dosaggio radioimmunologico (RIA) utilizzando il kit prodotto dalla Linco Research Inc. (St Louis, MO, USA).

Bibliografia

1. Ahima R.S., Dushay J., Flier S.N., PrabaKaran K. and Flier J. F. (1997). Leptin accelerates the timing of puberty in normal female mice. J Clin Invest 99, 391-395.

2. Ahima R.S., PrabaKaran K. and Mantzoros M. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 382, 250-252.

3. Alessi M.C., Peiretti F., Morange P., Henry M., Nalbone G. and Juhan-Vague I. (1997). Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. Diabetes 46, 860-867.

4. Banks W.A., Kastin A. J., Huang W., Jaspan J. B. and Maness L. M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. Peptides 17, 305-311.

5. Barash I.A., Cheung C.C., Weigle D.S., Ren H., Kabigting E. B., Kuiyper J.L., Cliffon D.K. and Steiner R. A. (1996). Leptin is a metaboli signal to the reproductive system. Endocrinology 137, 3144-3147.

6. Barb C.R., Barret J.B., Kraeling R.R., Rampacek G.B., Yan X. and Ramsay, T.G. (1997). Leptin modulation of luteinizing hormone (LH) secretion by pig pituitary cells culture. 5th Int Conf Pig Reprod 81(abst).

7. Batt R., Everard D., Gillies G., Wilkinson M., Wilson C. and Yeo T. (1982). Investigation into the hypogonadism of the obese mouse (genotype ob/ob). J Reprod Fertil 64, 363-371.

8. Baumann H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P. S., Kim H., Lai C.F. and Tartaglia L.A. (1996). The full length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptor. Proc Natl Acad Sci USA 93, 8374-8373.

9. Baumgartner R.N., Ross R.R., Waters D.L., Brooks W.M., Morley J.E., Montoya G.D. and Garry P.J. (1999). Serum leptin in elderly people: associations with sex hormones, insulin, and adipose tissue volumes. Obes Res 7, 141-149.

10. Berti L., Kellerer M., Capp E. and Haring, H. U. (1997). Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a PI3-kinase mediated effect. Diabetologia 40, 606-609.

11. Bjorbaek C. and Elmquist J.K. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. Mol Cell 1, 619-625.

12. Blum W.F., Engelaro P., Hanitsch S., Juul A., Hertel N., Muller J., Skaakkebeak N., Heiman M., Birkett M. and Rasher, W. (1997). Plasma leptin levels in healthy childrens and adolescents. J Clin Endocrinol Metab 82, 2904-2910.

13. Cameron J.L. (1996). Nutritional determinations of puberty. Nutr Rev 54, 17-22.

14. Campfiel L.A., Smith F.J. and Burn P. (1996). The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. Horm Metab Res 28, 619-632.

15. Caro J.F., Sinha M.K., Kolaczynski J.W., Zhang P.L. and Considine, R. V. (1996). Leptin: the tale of an obesity gene. Diabetes 45, 1455-1462.

16. Cattaneo E., De Fraja C., Conti L., Reinach B., Bolis L., Covoni S. and Liboli E. (1996). Activation of the JAK/STAT pathway lead to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. J Biol Chem 271, 23374-23379.

17. Cento R.M., Proto C., Spada R.S., Ragusa L., Reitano S., Napolitano V. and Lanzone A. (1999). Serum leptin concentrations in obese women with Down syndrome and Prader-Willi syndrome. Gynecol Endocrinol 13, 36-41.

18. Chehab F.F., Lim M.E. and Lu R. (1996). Correction of the sterility defect in the homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin. Nature 12, 318-320.

19. Chen H., Charlat O., Tartaglia L.A., Woolf E.A., Weng X., Ellis S.J., Lakey N.D., Culpepper J., Moore K.J., Breitbart R.E. et al. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 84, 491-495.

20. Cheung C.C., Thornton J.E., Kuiyper J.L., Weigle D.S., Cliffon D.K., and

Steiner R.A. (1997). Leptin is a metabolic gate for onset of puberty in the female rat. Endocrinology 138, 855-858.

21. Chumlea W.C. and Cronk C.E. (1981). Overweight among children with trisomy 21. J Mental Deficiency Res 25, 275-280.

22. Clement K.A., Vaisse C. and Lahlou N. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature 392, 398-401.

23. Cohen B., Novick D. and Rubinstein M. (1996). Modulation of insulin activities by leptin. Science 274, 1185-1188.

24. Coleman D. (1978). Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetologia, 141-148.

25. Coleman D. (1982). Diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetes 31, 1-6.

26. Collins S. and Surwit R.S. (1996). Pharmacologic manipulation of ob expression in a dietary model of obesity. J Biol Chem 371, 1-4.

27. Comuzzie A.G., Hixon J E. and Almasy L. (1997). A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. Nat Genet 15, 273-276.

28. Considine R. and Considine, E. (1995). Evidence against either a premature stop codon or the absense gene mRNAin human obesity. J Clin Invest 95, 2986-2988.

29. Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Marco C., McKee L.J., Bauer T.J. and Caro J.F. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. New England Journal of Medicine 334, 292-295.

30. Couillard C., Mauriege P., Prud'Homme D., Nadeau A., Tremblay A., Bouchard C. and Despres J.P. (1997). Plasma leptin concentrations: gender differences and associations with metabolic risk factors for cardiovascular disease. Diabetologia 40, 1178-1184.

31. De Vos P., Lefebvre A.M., Miller S.G., Guerremillo M., Wong K., Saladin R., Hamann L.G., Staels B., Briggs M.R., and Auwerx J. (1996).

Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of PPARg. Journal of Clinical Investigation 98, 1004-1009.

32. De Vos P., Saladin R., Auwerx J. and Staels, B. (1995). Induction of ob gene expression by corticosteroid is accompained by body weigh loss ans reduced food intake. J Biol Chem 270, 15958-15961.

33. Down J.L. (1995). Observations on an ethnic classification of idiots. 1866. Ment Retard 33, 54-56.

34. Emilsson V., Liu Y., Cawthorne M.A., Morton N.M. and Davenport, M. (1997). Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islet and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. Diabetes 46, 313-316.

35. Erickson J.C., Hollopeter G. and Palmiter, R. D. (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274, 1704-1707.

36. Fei H., Okano H.J., Li C., Lee G.H., Zhao C., Darnell R. and Freidman, J.M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. Proc Natl Acad Sci USA 94, 7001-7005.

37. Frederich R.C., Haman, A., Anderson S., Lollmann B., Lowell B.B. and Flier J.S. (1995a). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. Nature Medicine 1, 1311-1314.

38. Frederich R.C., Lollmann B., Hamann A., Napolitano-Rosen A., Kah B. B., Loweu B.B. and Flier J.S. (1995b). Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. J Clin Invest 96, 1658-1663.

39. Friedman J., Leibel R.L., Siegel D.A., Walsh J. and Bahary N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. Genomics 11, 1054-1062.

40. Frisch R.E. and McArthur J. (1974). Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight or height necessary for maintenance or onset. Science 185, 949-951.

41. Funahashi T., Shimomura I., Hiroka H., Arai T. and Takemura K.

(1995). Enhanced expression of rat obese (ob) gene in adipose tissue of ventromedial hypothalamus (VHM) lesioned rat. Biochemical and Biophysical Research Communications 211, 469-475.

42. Ghilardi N. and Ziegler, S. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6231-6235.

43. Green E.D., Maffei M., Braden V.V., Proenca R., DeSilva U., Zhang Y., Chua S.C. Jr., Leibel R.L., Weissenbach J. and Friedman J.M. (1995). The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. Genome Res 5, 5-12.

44. Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K. and Friedman J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science 269, 543-546.

45. Hamilton B.S. and Paglia D. (1995). Increased obese mRNAexpression in omental fat cells, from massively obese humans. Nature Medicine 1, 953-956.

46. He Y., Chen H., Quon M.J. and Reitman M. (1995). The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. Journal of Biological Chemistry 270, 28887-28891.

47. Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P. and Mercer J.G. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 11073-11078.

48. Hollenberg A.N., Susulic V.S. and Madura J.P. (1997). Functional antagonism between CCAAT/enhancer binding protein?? and peroxisome proliferetor-activated receptor g on the leptin promoter. Journal of Biological Chemistry 272, 5283-5290.

49. Holm A.V., Cassid, B.S. and Butler C.M. (1993). Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. Pediatrics 91, 398-402.

50. Houseknecht K.L., Baile C.A., Matteri R.L. and Spurlock, M. E. (1998). The biology of leptin: a review. Journal of Animal Science 76, 1405-1420.

51. Kallen C.B. and Lazar M.A. (1996). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5793-5796.

52. Kalra S.P., Dube M.G., Pu S., X, B., Horvath T.L. and Kalra P. S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocr Rev 20, 68-100.

53. Kalra S.P. and Kalra P.S. (1996). Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. Front Neuroendocrinol 17, 371-401.

54. Kennedy G.C. and Mitra J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. Journal of Physiology 166, 408-418.

55. Kieffer T.J., Heller R.S., Leech C.A., Holz G.G. and Habener J.F. (1997). Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K+ channels in pancreatic beta-cells. Diabetes 46, 1087-1093.

56. King P.J., Widdowson, P.S., Doods H. and William, G. (2000). Regulation of neuropeptide Y release from hypothalamic slices by melanocortin-4 agonists and leptin. Peptides 21, 45-48.

57. Kolacynski J.W., Ohannesian J., Considine R.V., Marco C. and Car, J. F. (1996c). Response of leptin to short term and prolonged overfeeding in humans. J Clin Endocrinol Metab 91, 4162-4165.

58. Kroder G., Kellerer M. and Haring H.U. (1996). Effect of leptin on insulin signalling in rat-1 fibroblast overexpressing HIR. Exp Clin Endocrinol Diabetes 104 (Suppl.2), 66 (Abst).

59. Landt M. (2000). Leptin binding and binding capacity in serum. Clin Chem Mar 46, 379-384.

60. Lane P. and Dickie M. (1954). Fertile, obese male mice. J Hered 45, 56-58.

61. Lee G.H., Proenca R., Montez J.M., Carroll K.M., Darvishzadeh J.G., Lee J.F. and Friedman J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature 379, 632-635.

62. Lefebvre A.M., Laville M., Vega N., Riou J.P., Van Gaal L., Auwerx J.

and Vidal H. (1998). Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. Diabetes 47, 98-113.

63. Liou S.S., Lim J.M., Blair R.M. and Hansel W. (1997). Leptin causes release of LH and FSH from perfused murine and bovine pituitary glands. Biol Reprod 56(Suppl.1), 171 (Abst.).

64. Madej T., Boguski M.S. and Bryant S.H. (1995). Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. FEBS Lett 373, 13-18.

65. Maffei M., Fei H., Lee G.H., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrel R., Ailhaud G. and Friedman J.M. (1995a). Increased expression in adipocytes of Ob RNAin mice with lesion of the hypothalamus and with mutations at the ob locus. Proc Natl Acad Sci USA92, 6957-6960.

66. Maffei M., Halaa, J., Ravussin E., Pratley R.E., Lee G.H., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R., Ranganathan S. and et al. (1995b). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1, 1155-1161.

67. Maffei M., Stoffel M., Barone M., Moon B., Dammermann M., Ravussin E., Bogardus C., Ludwig D.S., Flier J.S., Talley M. et al. (1996). Absence of mutations in the human ob gene in obese / diabetic subjects. Diabetes 45, 679-682.

68. Magni P., Vettor R., Pagano C., Calcagno A., Beretta E., Messi E., Zanisi, M., Martini L. and Motta M. (1999). Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. Endocrinology 140, 1581-1585.

69 Maione D., Di Carlo E. and Li W. (1998). Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. Embo J 17, 5588-5597.

70. Mercer J.G., Hoggar, N., Williams L.M., Lawrence C.B., Hannah L.T., Morgan P.J. and Trayhurn P. (1996a). Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol 8, 733-735.

71. Mercer J.G., Hoggard N., Williams L.M., Lawrence C.B., Hannah L.T. and Trayhurn P. (1996b). Localization of leptin receptor mRNAand the

long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett 387, 113-116.

72. Miller S.G., De Vos P. and Guerre-Millo M. (1996). The adipocyte specific transcription factor C/EBP? modulates human OB gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 93, 5507-5511.

73. Minocci A., Savia G., Lucantoni R., Berselli M.E., Tagliaferri M., Calò G., Petroni M.L., De Medici C., Viberti G.C. and Liuzzi A. (2000). Leptin plasma concentrations are dependent on body fat distribution in obese patients. Int J Obesity 24, 1139-1144.

74. Montague C.T. and Prins J. (1996). Depot - and sex - specific differences in human leptin mRNA expression. Diabetes 46, 342-347.

75. Morash B., L, A., Murphy P.R. and Wilkinson, M. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. Endocrinology 140, 5995-5998.

76. Muller G., Ertl J., Gerl M. and Preibisch, G. (1997). Leptin impairs metabolic action of insulin in isolated rat adipocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 272, 10585-10593.

77. Nagy T.R., Gower B.A., Trowbridge Dezenberg C., Shewchuz R.M.,and Goran M.I. (1997). Effect of gender, ethinicity, body composition and fat distribution on serum leptin concentrations in children. J Clin Endocrinol Metab 82, 2148-2152.

78. Nakashima K., Narazaki M. and Taga T. (1997). Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130. FEBS Lett 401, 49-52.

79. Nolan J.J., Olefsky J.M., Nyce M.R., Considine R.V. and Caro J.F. (1996). Effect of troglitazone on leptin production: studies in vitro and human subject. Biochemistry-Moscow 61, 705-710.

80. Norman R.J. and Clark A.M. (1998). Obesity and reproductive disorders: a review. Reprod Fertil Dev 10, 55-63.

81. Oslund R.E., Yang J.W., Klein S. and Gingerich R. (1996). Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet age, and metabolic covariates. J Clin Endocrinol Metab 81, 3909-3913.

82. Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T. and Collins F. (1995a). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science 269, 540-543.

83. Pelleymounter M.A., Cullen M.J. and Wellman C.L. (1995b). Characteristics of BDNF-induced weight loss. Exp Neurol 131, 229-238.

84. Pi-Sunyer F.X., Laferrere B., Aronne L. and Bray G.A.J. o. C.E. a. M.-. (1999). Obesity a modern day epidemic. J Clin Endocrinol Metab 84, 3-12.

85. Pu S., Dube M.G., Edwards T.G., Kalra S.P. and Kalra P.S. (1999). Disruption of neural signaling within the hypothalamic ventromedial nucleus upregulates galanin gene expression in association with hyperphagia: an in situ hybridization analysis. Brain Res Mol Brain Res 64, 85-91.

86. Rosmond R., Lapidus L., Bjorntorp P. (1996). The influence of occupational e social factor on obesity and body fat distribution in middle-aged men. International Journal of Obesity. 20: 599-607

87. Rosenbaum M., Prieto V., Hellmer J., Boschmann M., Krueger J., Leibel, R.L. and Ship A.G. (1998). An exploratory investigation of the morphology and biochemistry of cellulite. Plast Reconstr Surg 101, 1934-1939.

88. Rotella C., Ricca V., Mannucci E. (1997). L'Obesità - Manuale per la Diagnosi e la Terapia. SEE - Firenze

89. Sainsbury A., Cusin I., Doyle P., Rohner-Jeanrenaud F. and Jeanrenaud, B. (1996). Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats increases obese gene expression in white adipose tissue. Diabetologia 39, 353-356.

90. Saladin R., De Vos P., Guerre-Millo M., Leturque A., Girald J., Staels B. and Auwerx J. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake and insulin administration. Nature 377, 527-529.

91. Schwartz M.W., Baskin D.G., Bukowski T.R., Kuijper I.L., Foster D., Lasser G., Prunkar, D.E., Porte D., Woods S.C., Seeley R.J. and Weigle D. S. (1996). Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide y gene expression in ob/ob mice. Diabetes 45, 531-535.

92. Schwartz M.W. and Seele, R.J. (1997a). Leptin increases hypothalamic proopio -melanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. Diabetes 46, 2119-2123.

93. Schwartz M.W. and Seeley R.J. (1997b). Neuroendocrine response to starvation and weight loss. New England Journal of Medicine 336, 1802-1811.

94. Senaris R., Garcia-Caballero T., Casabiell X., Gallego R., Castro R., Considine R.V., Dieguez C. and Casanueva F.F. (1997). Synthesis of leptin in human placenta. Endocrinology 138, 4501-4504.

95. Serradeil-Le Gal C., Lafontan M., Raufaste D., Marchand J., Pouzet B., Casellas P., Pascal M., Maffrand J.P. and Le Fur G. (2000). Characterization of NPY receptors controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes. FEBS Lett 475, 150-156.

96. Shimabukuro M., Koyama K., Chen G., Wang M.Y., Trieu F., Lee Y., Newgard C.B. and Unger R.H. (1997). Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. Proc Natl Acad Sci USA 94, 4637-4641.

97. Slieker L.J., Sloop K.W., Surface P.L., Kriauciunas A., LaQuier F., Manetta J., Bue-Valleskey J.M. and Stephens T.W. (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. J Biol Chem 271, 5301-5304.

98. Sprang S. and Bazan J. (1993). Cytochine Cytokine structural taxonomy and mechanism of receptor engagement. Current Opinion in Structural Biology 3, 815-827.

99. Stephens T.W., Basinski M., Bristow P.K., Bue-Valleskey J.M., Burgett S. G., Craft L., Hale J., Hoffmann J., Hsiung H.M., Kriauciunas A. and et al. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. Nature 377, 530-532.

100. Stewart D.E. (1992). Reproductive functions in eating disorders. Ann Med 24, 287-291.

101. Strobel A. and Issad T. (1998). A leptin mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. Nature 18, 213-215.

102. Suzuki R., Watanabe S., Hirai Y., Akirama K., Nishide T., Matasushima Y., Murayama H., Ohshima H., Shinomiya M. and Shirai k. (1993). Abdominal wall fat index, estimated by ultrasonography, for assestment of the ratio of visceral fat to subcutaneous fat in abdomen. Am J Med 95, 309-314.

103. Tanner J.M., Whitehead R.H., Cameron N., Marshall W.A., Healy M.J. R. and Goldstein H. (1983). Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW2 method). London: Academic Press.

104. Tartaglia L.A. (1997). The leptin receptor. J Biol Chem 272, 6093-6096.

105. Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., De Vos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T. and Deeds J. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 83, 1263-1271.

106. Trayhurn P., Duncan J.S. and Rayner D.U. (1995). Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. Biochem J 84, 729-733.

107. Ugazio A.G., Maccario R., Notarangelo L.D. and Burgio G.R. (1990). Immunology of Down syndrome: a review. Am J Med Genet Suppl 7, 204-212.

108. Wabitsch M., Blum W.F., Muche R., Braun M., Rasher W., Heinze E., Teller W. and Haumer H. (1997). Contribute of androgens to the difference in leptin production in obese Children an adolescent. Clin Endocrinol 100, 808-813.

109. Wade G. N. and Schneider J.E. (1992). Metabolic fuels and reproduction in female mammals. Neurosci Biobehav Rev 16, 235-272.

110. Wang J. and Leibowitz K.L. (1997). Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. Brain Res 777, 231-236.

111. Wang Q., Bing C. Al-Barazanj K., Mossakowaska D.E., Wang X.M., McBay D.L., Neville W.A., Taddayon M., Pickavance L., Dryden S. et al. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. Diabetes 46, 335-341.

112. Wauters M. (2000). Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. Eur J Endocrinol 143, 293-311.

113. Wauters R.N., Mertens I.L., Considine R.V., De Leeuw Van Gaal L. and 124-130. E.W.D. (1999). Are leptin levels dependent on body fat distribution in obese men and women? Eating Weight Disord 3, 124-130.

114. Wiesner G., Vaz M. and Collier G. (1999). Leptin is released from the human brain:influence of adipocity and gender. J Clin Endocrinol Metab 84, 2270-2274.

115. Woods S.C., Seeley R.J., Porte D.Jr. and Schwartz M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280, 1378-1383.

116. Yamashita T. and Murakami T. (1998). Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. Biochem & Biophysical Res Comm 246, 752-759.

117. Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Karanth S. and Mccann S.M. (1997). Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. Proc Natl Acad Sci USA 94, 1023-1028.

118. Zakrzewska K.E. (1997). Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: towards an understanding of leptin resistance. Diabetes 46, 717-719.

119. Zamorano P.L., Mahesh V.B., De Sevilla L.M., Chorich L.P., Bhat G.K., and Brann D.W. (1997). Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. Neuroendocrinology 65, 223-238.

120. Zhang F., Basenski M.B., Beals J.M., Briggs S.L., Churgay L.M., Clauson D.K., Dimarchi R.D., Furman T.C., Hale J.E., Hsiung H.M. et al. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin E-100. Nature 387.

121. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425-432.

Indice

Editoriale . . . . . pag. 3
Introduzione . . . . . » 5
1. L'obesità . . . . . » 5
1.1. Classificazione ed eziopatogenesi dell'obesità . . . . . » 6
1.2. Il tessuto adiposo: aspetti endocrini . . . . . » 11
1.3. Obesità maschile e femminile a confronto . . . . . » 12
2. Leptina . . . . . » 13
2.1. Leptina: un ormone in grado di collegare assunzione di cibo, dispendio energetico e funzione riproduttiva . . . . . » 14
2.2. Localizzazione anatomica . . . . . » 16
2.3. Livelli plasmatici . . . . . » 19
2.4. Recettori della leptina e vie di segnale . . . . . » 20
2.5. Effetti fisiologici della leptina e suo coinvolgimento nell'obesità . . . . . » 22
3. Leptina plasmatica: forma libera e forma legata . . . . . » 36
3.1. Rilevamento della leptina plasmatica libera e legata: metodiche a confronto . . . . . » 36
3.2. Leptina libera e legata: ipotesi su un loro differente ruolo fisiologico . . . . . » 37
4. Leptina e tiroide . . . . . » 41
4.1. Correlazioni leptina-asse HPT in animali da esperimento . . . » 41
4.2. Correlazioni leptina-asse HPT nella popolazione umana . . . . » 43
5. Determinazione dei livelli plasmatici di leptina . . . . . » 44
5.1. FPLC: una tecnica cromatografica basata sul principio di esclusione molecolare . . . . . » 44
Bibliografia . . . . . » 46
Indice . . . . . » 58

Caleidoscopio
Italiano

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1)*** **. Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: ***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito.*** **Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio.*** **Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali.*** **Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa.*** **Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia.*** **Ottobre '91.**
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: ***Le sonde di DNAe la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**
68. Zilli A., Biondi T.: ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**
69. Rizzetto M.: ***L'epatite Delta.*** **Marzo '92.**

70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali.* Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.* Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita.* Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.:*Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti.* Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa.* Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin.* Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83.Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.* Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza.* Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB).* Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare.* Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori.* Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98.La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99.Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100.Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma.* Marzo '96.
101.Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102.Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale.* Maggio '96.
103.Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.

104.Marcante R., Dalla Via L.: ***Il virus respiratorio sinciziale*****. Luglio '96.**
105.Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: ***Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tis - sutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative.*** **Ottobre '96.**
106.Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: ***Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale.*** **Novembre '96.**
107.Morganti R.: ***Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*****. Dicembre '96.**
108.Andreoni S.: ***Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*****. Gennaio '97.**
109.Salemi A., Zoni R.: ***Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*****. Febbraio '97.**
110.Meisner M.: ***Procalcitonina*****. Marzo '97.**
111.Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: ***Malattie a trasmissione sessuale (2)*****. Aprile '97.**
112.Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: ***Biosensori elettrochimici in Biomedicina.*** **Maggio '97.**
113.Valtriani C., Hurle C.: ***Citofluorimetria a flusso*****. Giugno '97.**
114.Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: ***Alcol e problemi correlati.*** **Settembre '97.**
115.Piccinelli M.: ***Depressione Maggiore Unipolare*****. Ottobre '97.**
116.Pepe M., Di Gregorio A.: ***Le Tiroiditi*****. Novembre '97.**
117.Cairo G.: ***La Ferritina*****. Dicembre '97.**
118.Bartoli E.: ***Le glomerulonefriti acute*****. Gennaio '98.**
119.Bufi C., Tracanna M.: ***Computerizzazione della gara di Laboratorio*****. Febbraio '98.**
120.National Academy of Clinical Biochemistry: ***Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide.*** **Marzo '98.**
121.Fava G., Rafanelli C., Savron G.: ***L'ansia.*** **Aprile '98.**
122.Cinco M.: ***La Borreliosi di Lyme*****. Maggio '98.**
123.Giudice G.C.: ***Agopuntura Cinese*****. Giugno '98.**
124.Baccini C.: ***Allucinogeni e nuove droghe (1)*****. Luglio '98.**
125.Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Basofili*****. Settembre '98.**
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: ***Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*****. Novembre '98.**
127.Baccini C.: ***Allucinogeni e nuove droghe (1I)*****. Dicembre '98.**
128.Muzi P., Bologna M.: ***Tecniche di immunoistochimica*****. Gennaio '99.**
129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: ***Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivira - li.*** **Febbraio '99.**
130.Castello G., Silvestri I.: ***Il linfocita quale dosimetro biologico*****. Marzo '99.**
131.AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: ***Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correla - ta.*** **Aprile '99.**
132.Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: ***Medicina Termale e Malattie Reumatiche.*** **Maggio '99.**
133.Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Eosinofili.*** **Giugno '99.**
134.Fusco A., Somma M.C.: ***NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*****. Luglio '99.**
135.Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: ***La menopausa*****. Settembre '99.**
136.Giglio G., Aprea E., Romano A.: ***Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi.*** **Ottobre '99.**
137.Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: ***Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati.*** **Novembre '99.**
138.Giovanella L.: ***Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica.*** **Dicembre '99.**
139.Paladino M., Cerizza Tosoni T.: ***Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management.*** **Gennaio 2000.**

140.La Vecchia C.: *Come evitare la malattia*. Febbraio 2000.
141.Rossi R.E., Monasterolo G.: *Cellule dendritiche*. Marzo 2000.
142.Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I)*. Aprile 2000.
143.Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II)*. Maggio 2000.
144.Croce E., Olmi S.: *Videolaparoscopia.* Giugno 2000.
145.Martelli M., Ferraguti M.: *AllergoGest.* Settembre 2000.
146.Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici.* Gennaio 2001.
147.Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: *L'umanizzazione dei servizi sanitari*. Febbraio 2001.
148. Giovanella L.: *I tumori della tiroide*. Marzo 2001.
149.Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: *L'ipertensione arteriosa*. Aprile 2001.
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: *Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*. Settembre 2001.
151.Dominici R.: *Riflessioni su Scienza ed Etica.* Ottobre 2001.
152.Lenziardi M., Fiorini I.: *Linee guida per le malattie della tiroide*. Novembre 2001.
153.Fazii P.: *Dermatofiti e dermatofitosi*. Gennaio 2002.
154.Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: *Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*. Febbraio 2002.
155. Trombetta C.: *Il Varicocele.* Marzo 2002.
156.Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: *Ambiente e polmone*. Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I *Markers tumorali.* Maggio 2002.
158. Loviselli A., Mariotti S.: *La Sindrome da bassa T3*. Giugno 2002.
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte.* Ottobre 2002.
160. Canini S.: Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato. Novembre 2002.
161. Atzeni M.M., Masala A.: *La β-talassemia omozigote*. Dicembre 2002.
162. Di Serio F.: *Sindromi coronariche acute*. Gennaio 2003.
163. Muzi P., Bologna M.: *Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*. Febbraio 2003.
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Marzo 2003.

I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono "storiche". Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 21, numero 164

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@libero.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Giusi Cunietti

Progettazione e Realizzazione
Restless Architect
of Human Possibilities s.a.s.

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Carmela Tiberti

Servizio Abbonamenti
Maria Grazia Papalia
Flavio Damarciasi

EDITORE

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax 010/8340310- 809070.
Internet URL: http://www.medicalsystems.it
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato, Caleidoscopio Letterario, Giornale della Associazione per l'Automazione del Laboratorio, Guida Pratica Immulite®, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa
LA STAMPA - Industrie Grafiche S.p.A.
Salita Pino Sottano, 3/C - Genova
Tel. 010 8360167 - Fax 010 8367321

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Marzo 2003
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano