

**Università degli Studi di Roma “La Sapienza”**



***Dipartimento “Paride Stefanini”***

**Dottorato in Fisiopatologia Chirurgica-XXII Ciclo**

**TESI DI DOTTORATO**

**CHIRURGIA DELL’OBESITÀ E GENETICA: INFLUENZA  
DELL’OBESITA’ MONOGENICA SUL PAZIENTE  
SOTTOPOSTO A BY-PASS GASTRICO**

Dottorando: Paolo Fabiano

Relatore Prof.ssa Chiara Montesani

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

## RIASSUNTO

Introduzione: L'obesità è il più comune problema nutrizionale dei paesi occidentali ed è in rapida crescita (globesità). E' uno dei problemi maggiori per la salute pubblica del ventunesimo secolo a causa della mortalità più elevata dei pazienti obesi e delle comorbidità che tale condizione fisica produce. Gli approcci conservativi ottengono una perdita di peso a lungo termine solo in una minoranza di individui altamente motivati.

Studi randomizzati controllati dimostrano che la chirurgia bariatrica è il solo trattamento che produce una perdita di peso efficace a lungo termine.

Studi su topi geneticamente obesi hanno portato alla scoperta di diverse mutazioni che successivamente sono state associate all'obesità patologica umana dell'adulto e del bambino, come ad esempio l'obesità associata al deficit di Leptina. La forma di obesità monogenica più comune è quella associata a mutazioni del gene del recettore della melanocortina-4 (MC4R).

I pazienti affetti da tale mutazione sono oggettivamente iperfagici.

Un altro gene che negli ultimi anni è stato associato all'obesità patologica è INSIG2. E' visto come il principale candidato per il controllo del livello del colesterolo plasmatico del topo. Recentemente un polimorfismo nucleotidico singolo (SNP), localizzato a circa 10 kb a monte dell'inizio del sito di trascrizione di INSIG2, è stato dimostrato essere associato con un più elevato rischio di obesità per i soggetti omozigoti CC in uno studio incrociato di adulti e bambini.

Scopo dello studio è di determinare l'influenza di queste mutazioni su una popolazione affetta da obesità patologica e sottoposti a by-pass gastrico e verificarne gli effetti sulle comorbidità.

Materiali e metodo: Studio retrospettivo su 195 pazienti sottoposti a by-pass gastrico per via laparoscopica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad uno studio preoperatorio standardizzato con la collaborazione di un endocrinologo, uno psichiatra ed un dietologo. E' stato effettuato uno studio genetico del DNA tramite prelievo di sangue (provetta EDTA 10

ml). Il DNA è stato studiato tramite amplificazione PCR della regione codificante il gene del recettore della melanocortina 4 (MC4R) e del polimorfismo nucleotidico singolo rs7566605 (SNPrs7566605).

Risultati: I pazienti inclusi nello studio sono stati 195. La popolazione femminile è risultata dell'83%, l'età media di 43 anni, e nel 65% dei casi vi era un'anamnesi familiare positiva per obesità. Il peso medio era di 124 kg, il BMI medio di 46 kg/m<sup>2</sup> (range 36-66) 169 pazienti erano affetti da obesità patologica e 26 da obesità severa con comorbidità associate. La perdita di peso in eccesso media ad 18 mesi è stata del 72% con una deviazione standard di +/-18% . Il BMI medio pre-op era di 46 kg/m<sup>2</sup> ed il post-op di 29 kg/m<sup>2</sup>. Sono stati riscontrati 26 pazienti affetti da mutazione di cui 9(4,6%) del gene MC4R e 17(8,7%) omozigoti CC per il polimorfismo nucleotidico singolo rs7566605.

La popolazione globale affetta da mutazione era così caratterizzata: donne 85%, peso medio 124 kg, BMI medio 45 kg/m<sup>2</sup> (range 38-54), obesità

severa 3 paziente, obesità patologica 23 pazienti, anamnesi familiare positiva per obesità 69%.

Non sono state riscontrate differenze statistiche significative tra popolazione sana ed affetta da mutazione per ciò che riguarda il calo ponderale e le comorbidità associate.

Discussione: Il nostro studio insieme alla revisione della letteratura, sottolineano sia le enormi risorse che si stanno utilizzando nello studio dell'obesità per individuarne le cause genetiche, giungendo già a soluzioni pratiche nel caso dell'obesità monogenica causata dalle mutazioni del gene MC4R con la sintesi di un agonista efficace sull'iperfagia e quindi sul peso corporeo, sia l'importanza della chirurgia bariatrica che ha un'altissima efficacia sui pazienti obesi affetti o non da mutazioni genetiche associate ad obesità patologica ed è ancora la sola cura a lungo termine per l'obesità patologica.

Conclusioni: Questo studio è un ulteriore passo verso il tentativo di rendere omogenea una popolazione di pazienti, gli obesi, di per se estremamente eterogenea, e di trovare un algoritmo terapeutico con il contributo della genetica, dato certo ed immutabile, che ha un ruolo rilevante in questa patologia.

## INTRODUZIONE

L'obesità è il più comune problema nutrizionale dei paesi occidentali ed è in rapida crescita (globesità). E' uno dei problemi maggiori per la salute pubblica del ventunesimo secolo a causa della mortalità più elevata dei pazienti obesi e delle comorbidità che tale condizione fisica produce; ipertensione, dislipidemia, diabete mellito e malattie cardiovascolari sono le principali patologie che si accompagnano all'obesità patologica.(1)

La relazione tra obesità patologica e mortalità precoce è ben conosciuta (2-3). Uno studio sistematico recente su più di 890000 casi ha dimostrato che ogni 5 punti di IMC (Indice di Massa Corporea) in più rispetto al valore normale di 25 ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ) aumenta del 30% la mortalità globale (4). Gli approcci conservativi per gestire l'obesità (dieta, esercizio fisico, terapia cognitiva), ottengono una perdita di peso a lungo termine solo in una minoranza di individui altamente motivati(5). Ogni tipo di farmaco

dimagrante produce una perdita di peso modesta, inoltre possono essere assunti solo per un periodo limitato di tempo(6).

Studi randomizzati controllati dimostrano che la chirurgia bariatrica è il solo trattamento che produce una perdita di peso efficace a lungo termine(7). Le diverse classi di obesità sono classificate secondo l'Indice di Massa Corporea (Tab. 1) Le indicazioni alla chirurgia, codificate fin dal 1991, sono date da un IMC superiore a  $40 \text{ Kg/m}^2$  , o tra 35 e 40 se si associano comorbidità.

Nonostante la modificazione del comportamento alimentare ed il ridotto esercizio fisico possono in parte spiegare l'aumento della prevalenza dell'obesità, esiste un'evidente contributo genetico alla regolazione del peso corporeo. Mutazioni responsabili dell'obesità riscontrata in alcune sindromi (Bardet-Biedl, Cohen) sono state recentemente identificate, ma in nessun caso è stato dimostrato il legame tra il gene mutato ed il disordine del bilancio energetico (8)



Studi su topi geneticamente obesi hanno portato alla scoperta di diverse mutazioni che successivamente sono state associate all'obesità patologica umana dell'adulto e del bambino. Ad esempio la deficienza della leptina porta all'obesità, iperfagia, infertilità ed alla compromissione dell'immunità mediata dai linfociti T sia nelle cavie(9-10) che nell'essere umano(11-12), e la somministrazione di leptina inverte completamente le manifestazioni fenotipiche in entrambe le specie(13-17).

La forma di obesità monogenica più comune è quella associata a mutazioni del gene del recettore della melanocortina-4 (MC4R)(18). MC4R è una proteina di 332 aminoacidi codificata da un singolo esone localizzato sul braccio lungo del cromosoma 18 (18q22) (19-20). MC4R appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G trans membrana, e segnala attraverso l'attivazione dell'adenilato ciclasi(1). L'importanza di MC4R nella regolazione del peso corporeo è dimostrata dal fenotipo obeso delle cavie con mutazione omozigote. Le mutazioni eterozigote presentano un

fenotipo intermedio, e le femmine sono colpite più severamente rispetto ai maschi(21). Farooqi ha riscontrato lo stesso comportamento in studi su popolazioni di individui obesi, riscontrando però anche gruppi etnici dove la mutazione non produceva obesità. Sono state riscontrate più di 70 mutazioni del recettore MC4R. I portatori del gene mutato oltre ad avere un incremento della massa grassa lo hanno anche della massa magra, cosa che non si riscontra nella deficienza di leptina. La crescita lineare di questi soggetti è impressionante, i bambini affetti hanno una deviazione dell'altezza standard di + 2 rispetto alla popolazione standard o ad altri bambini obesi. I soggetti portatori della mutazione hanno inoltre livelli più alti di insulina a digiuno. I soggetti affetti sono oggettivamente iperfagici ma non come si è visto nella carenza di leptina(22). Da notare è la possibilità di predire la quantità di cibo ingerita durante il test rispetto alla severità della mutazione. Inoltre, i soggetti con la mutazione migliorano

con il passare degli anni, gli adulti hanno un'iperfagia minore rispetto ai bambini(18).

Un altro gene che negli ultimi anni è stato associato all'obesità patologica è INSIG2. Questo gene, che si trova sul braccio lungo del cromosoma 2 (2q14.1), codifica proteine strettamente correlate al reticolo endoplasmatico che bloccano l'attivazione proteolitica di proteine leganti che regolano gli steroli e proteine di membrana associate a fattori di trascrizione che attivano la sintesi del colesterolo e acidi grassi nelle cellule animali. Queste proteine limitano anche la lipogenesi negli adipociti maturi e bloccano la differenziazione dei pre-adipociti(23-25). Inoltre, INSIG2 media sia il metabolismo del colesterolo che degli acidi grassi nei roditori(23-26). E' visto come il principale candidato per il controllo del livello del colesterolo plasmatico del topo(27).

“Genomic-wide association” è una particolare tecnica che riesce a prendere in considerazione centinaia e migliaia di varianti genetiche

contemporaneamente. In questa valutazione vengono utilizzati fino ad 1 milione di polimorfismi nucleotidici singoli (SNP) che sono distribuiti in modo uniforme nell'intero genoma. Nella regolazione del peso corporeo queste valutazioni hanno un impatto maggiore nell'identificazione di poligeni rilevanti.

Recentemente un polimorfismo nucleotidico singolo (SNPrs7566605), localizzato a circa 10 kb a monte dell'inizio del sito di trascrizione di INSIG2, è stato dimostrato essere associato con un più elevato rischio di obesità per i soggetti omozigoti CC in uno studio incrociato di adulti e bambini(28).

Scopo dello studio è studiare il ruolo del gene MC4R situato sul braccio lungo del cromosoma 18 (18q22) e del SNPrs7566605 situato nella regione 5' del gene INSIG2 a sua volta situato sul braccio lungo del cromosoma 2 (2q14.1), entrambi implicati nell'obesità del bambino e dell'adulto, in una popolazione affetta da obesità patologica sottoposta ad intervento

chirurgico di by-pass gastrico per via laparoscopica, ed analizzare il comportamento dei pazienti con genotipo mutato per ciò che riguarda il dimagrimento post-operatorio e le co-morbidità associate.

## MATERIALI E METODO

Studio retrospettivo su 195 pazienti selezionati in base all'intervento bariatrico subito, by pass gastrico per via laparoscopica, ed in base alla data dell'intervento per avere un follow-up minimo di 18 mesi.

Pre-op: tutti i pazienti sono stati sottoposti ad uno studio preoperatorio standardizzato con la collaborazione di un endocrinologo, uno psichiatra ed un dietologo. L'indice di massa corporea è stato misurato durante la prima visita. Analisi di laboratorio sono state effettuate per determinare i livelli preoperatori di colesterolo, trigliceridi, emoglobina glicata.

Tecnica operatoria: il by-pass intestinale inizia calcolando 50 centimetri dal legamento di Treitz e resecando l'intestino tenue con endo-GIA; si misurano poi 120 cm partendo dall'ansa efferente e a questo livello si confeziona un' anastomosi latero-laterale totalmente meccanica; si realizza quindi il passaggio trans-mesocolico appena sopra il legamento di Treitz, si

fa passare attraverso l'ansa efferente e la quantità adeguata di intestino tenue per non creare tensione nella futura anastomosi gastro-digiunale; prima di concludere questo tempo operatorio si fissa con punti semplici l'ansa intestinale al passaggio trans-mesocolico per evitare possibili ernie interne. Si procede quindi al confezionamento della tasca gastrica con l'aiuto di una sonda di 33 Fr. Una volta conclusa la tasca si "pesca" l'ansa efferente che si trova dietro il rimanente gastrico e si realizza un'anastomosi latero-laterale con endo-Gia e si sutura la breccia a punti staccati. (Foto)

Genetica: è stato effettuato uno studio genetico del DNA tramite prelievo di sangue (provetta EDTA 10 ml). Tale prelievo è stato effettuato al momento della visita ambulatoriale post-operatoria per il progetto di ricerca, senza particolari condizioni ambientali e fisiche (digiuno, orario) non richieste per tale tipologia di campione.

Lo SNP rs7566605 in prossimità di INSIG2 è stato genotipizzato mediante il sensibile metodo del “ pirosequenziamento”. Il “ Pyrosequencing” è una tecnica di sequenziamento del DNA che si basa sulla valutazione di pirofosfati (PPi) che si liberano durante la sintesi del DNA. In una cascata di reazioni enzimatiche è generata luce visibile proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.

La cascata di eventi inizia con una reazione di polimerizzazione dell'acido nucleico in cui i pirofosfati sono rilasciati come risultato dell'incorporazione di nucleotidi da parte della polimerasi.

Il rilascio di PPi è in seguito convertito in ATP da ATP sulfasi che fornisce energia alla luciferasi per ossidare la luciferina con conseguente generazione di luce.

Poiché è conosciuto il nucleotide aggiunto, la sequenza dello stampo può essere valutata.

I primers erano : 5'-3'



I prodotti della PCR ( polymerase chain reaction) sono stati valutati su apparecchio QUIAGEN.

In seguito la genotipizzazione del gene MC4R è stato eseguito con sequenziamento diretto. In breve, il DNA è stato estratto da leucociti di sangue periferico secondo le procedure standard. L'analisi mutazionale è stata eseguita con metodica PCR e sequenziamento diretto degli esoni e delle sequenze introni vicine al gene MC4R. I primers erano progettati per portare un prodotto max di 500 bp ( paia di basi) ed un minimo di 40 bp fiancheggianti il sito interessato mediante l'uso di un programma PRIMER3.

TAG polimerasi MI3F e MI3R sono state rispettivamente aggiunte per avanzare ed invertire i primers.

Per ciascun campione 20 microgrammi di DNA sono stati amplificati in 10 microlitri di PCR mediante l'uso di AmpliTag Gold (Perkin Elmer Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA) Il sequenziamento bidirezionale è stato

eseguito usando ambedue i primers M13 ed il kit sequenziamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) (Perkin Elmer Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA) e la separazione è stata effettuata in un analizzatore di DNA 3130xl (Perkin Elmer Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA). L'accertamento della base, della qualità e l'assemblaggio sono stati eseguiti usando un software Phred a PolyPhred. Per filtrare una sequenza di alta qualità, solo sequenze con  $\text{score} \geq 27$  sono state incluse nell'analisi.

Per minimizzare risultati falsi-negativi, ogni lettura di bassa qualità è stata esaminata visivamente.

Tutte le sequenze varianti sono state identificate da ispezione manuale del cromatogramma.

È stata analizzata la curva di dimagrimento della popolazione globale dopo il by-pass gastrico tramite la perdita di peso in eccesso (EWL).

Sono stati esaminati i valori pre e post operatori di colesterolo, trigliceridi, emoglobina glicata. Inoltre abbiamo registrato ed analizzato la quantità di insulina, antidiabetici orali ed antiipertensivi assunti prima e dopo l'intervento chirurgico. Tutti i risultati sono stati analizzati prima globalmente e poi separatamente confrontati tra la popolazione globale affetta da entrambe le mutazioni e pazienti "sani", e successivamente lo stesso è stato fatto prendendo in considerazione le 2 mutazioni separatamente.

Tutti i pazienti hanno dato la loro autorizzazione alla partecipazione allo studio tramite consenso informato. L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test del  $\chi^2$  prendendo come valore limite di significatività statistica  $p < 0,05$ .

Tale studio è stato realizzato al Centre Hospitalier di Lussemburgo presso il reparto di Chirurgia Generale diretto dal Prof. Juan Santiago Azagra e dalla Dott.ssa Martine Goergen in collaborazione con la Prof.ssa Karin Dahan

del Centro di Genetica Umana della Clinica Universitaria di Sant-Luc in

Belgio.

## RISULTATI

I pazienti inclusi nello studio sono stati 195. La popolazione femminile è risultata dell'83%, l'età media di 43 anni, e nel 65% dei casi vi era un'anamnesi familiare positiva per obesità. Il peso medio era di 124 kg, il BMI medio di 46 kg/m<sup>2</sup> (range 36-66) 169 pazienti erano affetti da obesità patologica e 26 da obesità severa con comorbidità associate. La perdita di peso in eccesso media ad 18 mesi è stata del 72% con una deviazione standard di +/-18% (grafico 1). Il BMI medio pre-op era di 46 kg/m<sup>2</sup> ed il post-op di 29 kg/m<sup>2</sup>.

Il 32% dei pazienti (62pz) era affetto da ipertensione arteriosa prima dell'intervento chirurgico, nel post-operatorio il 47%(29pz) hanno subito un miglioramento dell'ipertensione con diminuzione della quantità di farmaci assunta, il 48%(30pz) è guarita dall'ipertensione con sospensione dei farmaci(miglioramento+guarigione 95%).

Il 20% dei pazienti (39pz) era affetto da diabete di II tipo prima del by-pass gastrico, dopo la chirurgia il 31% (12pz) è migliorata riducendo l'assunzione di insulina ed antidiabetici orali, il 64% è guarita ed ha sospeso i farmaci(miglioramento+guarigione 95%).

Prima dell'intervento 57 pazienti (29%) avevano il valore dell'emoglobina glicata superiore al 6,0%. A 18 mesi dall'intervento di questi il 65%(37pz) era sceso sotto il 6,0%.

Sono stati riscontrati 26 pazienti affetti da mutazione di cui 9(4,6%) del gene MC4R e 17(8,7%) omozigoti CC per il polimorfismo nucleotidico singolo rs7566605.

La popolazione globale affetta da mutazione era così caratterizzata: donne 85%, peso medio 124 kg, BMI medio 45 kg/m<sup>2</sup> (range 38-54), obesità severa 3 pazienti, obesità patologica 23 pazienti, anamnesi familiare positiva per obesità 69%.

La popolazione affetta da mutazione del gene INSIG2 era così caratterizzata: donne 82 %, peso medio 124 kg, BMI medio 45 kg/m<sup>2</sup> (range 38-54), obesità severa 1 paziente, obesità patologica 16 pazienti, anamnesi familiare positiva per obesità 71%.

La popolazione affetta da mutazione del gene MC4R era così caratterizzata: donne 89%, peso medio 125 Kg, BMI medio 44 kg/m<sup>2</sup> (range 39-51), obesità severa 2 pazienti, obesità patologica 7 pazienti, anamnesi familiare positiva per obesità 67%. La tabella 2 riassume i vari tipi di mutazioni riscontrate per questo gene.

Il comportamento alimentare dei vari gruppi è riassunto nella tabella 3.

Le curve di dimagrimento a 18 mesi dei pazienti con e senza mutazione, rappresentata nel grafico 1, attesta una differenza non significativa di perdita di peso dei differenti gruppi.

L'analisi della variazione post operatoria delle comorbidità (ipertensione arteriosa e diabete) è riassunta nelle tabelle 4 e 5. La tabella 6 mostra la

variazione post operatoria dell'emoglobina glicata. La tabella 7 si riferisce al comportamento post operatorio di colesterolo e trigliceridi. Nella tabella 8 sono riassunti i valori statistici di  $p$  per l'eccesso di peso e per le comorbidità. Tutte le tabelle prendono in considerazione la popolazione senza mutazione (M-), la popolazione globale con mutazione (M+) e le popolazioni con le 2 diverse mutazioni dei geni INSIG2 e MC4R, ad eccezione dei valori di colesterolo e trigliceridi dove sono stati messi a confronto i pazienti senza mutazione con la popolazione globale con mutazione a causa della povertà dei numeri.



## DISCUSSIONE

Nel 2002 in Inghilterra si pubblicano i risultati di uno studio che paragona i costi della chirurgia dell'obesità con i costi delle comorbidità generate dall'obesità: per la chirurgia i costi variano da 45,8 milioni di sterline (52,1 milioni di euro) e 49 milioni di sterline; il costo del trattamento delle comorbidità dell'obesità patologica si aggirava intorno a 1075 milioni di sterline all'anno(29).

Secondo la SIO (Società Italiana dell'Obesità), in Italia il problema obesità riguarda il 10,5% dei maschi ed il 9,1% delle donne. In totale risultano sovrappeso il 34,2% degli italiani ed obesi il 9,8%. Se si manterrà questa tendenza nel 2025 il tasso di obesità negli adulti arriverà al 14%(30).

Per quel che riguarda l'obesità infantile, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, 1 ragazzo su 5 in Europa è in sovrappeso. Ogni anno, agli oltre 14 milioni di giovani europei in sovrappeso, di cui 3 milioni

obesi, si aggiungono ogni anno 400 mila nuovi sovrappeso.(31-34) I dati del 2010 sono ancora più allarmanti. Il tasso di obesità e sovrappeso sarà del 38.2% di cui il 10% di obesi(31). Inoltre dati recenti indicano che i bambini in sovrappeso tendono a rimanere obesi da adulti(32). In Europa circa 1 milione di decessi sono attribuibili all'obesità ogni anno. L'OMS ha calcolato che all'obesità dell'adulto è imputabile il 6% della spesa sanitaria europea(34).

Per i bambini e adolescenti italiani, al di sotto della maggiore età, l'obesità infantile si attesta al 4% in media, ma le stime della SIO sono drammatiche: nel 2025, con questa tendenza, l'obesità infantile in Italia triplicherà, arrivando al 12,2%(35-37).

Da uno studio svedese pubblicato su BMJ, dove si analizzava gli effetti combinati del sovrappeso e del fumo negli adolescenti, risulta che la mortalità è identica nei soggetti obesi non fumatori e nei fumatori normopeso, quindi più del doppio rispetto ai non fumatori normopeso.

Simili sono i risultati per il sovrappeso(38). In sostanza l'obesità uccide quanto il fumo.

Tanti numeri per sottolineare la rilevanza di un problema sanitario che sta affliggendo il mondo intero e che giustifica le enormi risorse che si stanno utilizzando per studiare tale patologia da vari punti di vista. In questo studio si è cercato di prenderne due, la genetica e la chirurgia dell'obesità, per analizzare come l'una interagisce con l'altra.

Il meccanismo genetico di regolazione del peso corporeo è complesso; presumibilmente sono coinvolti un numero notevole di geni. Varianti geniche che hanno una lieve influenza sul peso corporeo sono chiamati poligeni, sono comuni nella popolazione generale e sono diversi da persona a persona. Al contrario esistono singoli geni che sono in grado da soli di influenzare il peso corporeo (39). Questo studio ha preso in esame 2 di questi geni, MC4R(recettore della melanocortina 4) e INSIG2.

Attualmente sono conosciute più di 70 diverse mutazioni di MC4R, la maggior parte delle quali associate ad individui affetti da obesità patologica(18,40-43). In letteratura la frequenza di tali mutazioni in popolazioni di individui obesi varia dal 2% al 5%. Nel nostro studio la percentuale è stata del 4.6%. I soggetti affetti da questa mutazione hanno un IMC significativamente più alto della popolazione sana, 4.5 kg/m<sup>2</sup> e 9.5 kg/m<sup>2</sup> rispettivamente in uomini e donne(44).

Sono state trovate 5 differenti mutazioni di MC4R in 9 pazienti non correlati. Di esse, due mutazioni, le sostituzioni Val103Ile (rs2227916, c.307G> A) e Ile251Leu (rs52820871, c.751A> C) sono state precedentemente segnalate come mutazioni con guadagno di funzione del recettore MC4 modulando quindi in positivo l'attività del recettore con il risultato di prevenire l'obesità [45]. Evidentemente nel nostro studio queste mutazioni non hanno avuto alcun effetto protettivo verso l'obesità patologica

Al contrario la mutazione p.Asp298Asn, (sostituzione c893G>A) mai segnalata finora può essere considerata come mutazione che causa obesità autosomica dominante.

Nel nostro studio non abbiamo utilizzato un gruppo di controllo di persone normopeso, ma abbiamo cercato di capire se la chirurgia dell'obesità aveva lo stesso effetto su pazienti con o senza mutazione. Gli individui affetti da mutazione del gene MC4R avevano un IMC medio di 44 kg/m<sup>2</sup>, non molto differente dalla popolazione obesa senza mutazione(46 kg/m<sup>2</sup>).

In uno studio su 288 famiglie (Framingham Heart Study), 694 individui sono risultati portatori del polimorfismo nucleotidico singolo SNPrs7566605 nelle vicinanze del gene INSIG2 nella forma omozigote CC. Secondo tale studio tale polimorfismo predispone all'obesità sia l'adulto che il bambino. Circa il 10 % della popolazione erano portatori del genotipo CC(28). Nel nostro studio la percentuale è stata del 8.7%.

L'associazione con l'obesità di questa mutazione è stata confermata da altri tre studi, con un rischio di divenire obesi aumentato del 30% nei soggetti portatori del genotipo omozigote CC(28). Successivamente altri studi non hanno confermato l'associazione tra il polimorfismo rs7566605 e l'obesità(46-50) Altro risultato contraddittorio per questo gene è dato da 2 studi di intervento sullo stile di vita: gli adulti affetti da mutazione omozigote CC subiscono una perdita di peso significativa; lo stesso non accade per uno studio su 293 bambini obesi che perdono significativamente meno peso rispetto al gruppo di controllo senza mutazione(51-52). In uno studio del 2009 si ipotizza che tale discordanza possa essere dovuta alla omogeneità ed eterogeneità che scaturisca dai diversi tipi di popolazione, mista o stratificata, oltre alle influenze ambientali come dimostrano i diversi risultati in diverse etnie(53). Tale studio conclude affermando che per l'obesità rimane una sfida calcolare accuratamente l'introito dietetico e l'attività fisica(53). Nel nostro studio è presente sia omogeneità, data

dall'obesità stessa e dall'intervento chirurgico comune a tutti i pazienti, sia l'eterogeneità causata dalle diverse etnie della popolazione: Lussemburghesi(50%), Portoghesi(40%) ed Italiani(10%). Nel nostro studio, anche in questo caso il BMI medio degli individui affetti da questa mutazione non si differenziava da quello della popolazione obesa senza mutazione (45 kg/m<sup>2</sup>).

Per ciò che riguarda il comportamento alimentare non è stata riscontrata una differenza statistica significativa tra i pazienti con e senza mutazione.

In uno studio del 2003 Branson conclude che i portatori di mutazione del gene MC4R sono al 100% binge eating(54) tale dato è stato successivamente messo in discussione da altri studi(55). Nel nostro studio i portatori di tale mutazione con disturbo alimentare di tipo binge eating erano solo il 56%, risultato che va contro le affermazioni di Branson.

La curva di dimagrimento rappresentata dal grafico 1 mostra una differenza non statisticamente significativa tra i gruppi, il gruppo con EWL più basso

a 18 mesi sono i pazienti affetti da mutazione del gene INSIG2 e paradossalmente quello con EWL più alto sono i pazienti affetti da mutazione del gene MC4R.

Se prendiamo in esame la storia clinica post-operatoria di ipertensione arteriosa e diabete e con quest'ultimo anche la variazione dell'emoglobina glicata, anche in questo caso non sono state riscontrate differenze statisticamente significative. Stesso risultato è stato ottenuto per i valori di colesterolo e trigliceridi. Unico valore statisticamente significativo rilevato è stato quello che metteva a confronto la popolazione affetta da mutazione sul gene INSIG2 e la popolazione sana per ciò che riguardava i valori dell'emoglobina glicata (00.2). Tale valore è dato dall'alta percentuale di pazienti affetti da diabete tipo II nella popolazione con mutazione del gene INSIG2, non riscontrata in letteratura e forse data da una maggiore insulino resistenza, e dall'altissima efficacia del by-pass gastrico su tale patologia associata all'obesità'.



In letteratura ci sono solo 2 lavori precedenti a questo che analizzano mutazioni genetiche che portano ad obesità in un gruppo di pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica(56-57). Entrambi prendono in esame pazienti sottoposti a bendaggio gastrico. Uno indaga il tasso di complicazioni post-operatorie nei pazienti con mutazione del gene MC4R e conclude che questi pazienti non sono associati ad un più alto tasso di complicazioni post-op. L'altro studio prende in esame alcuni poliformismi nucleotidici singoli associati a resistenza insulinica in pazienti obesi sottoposti a LAGB e trova differenze statisticamente significative nella perdita di peso tra pazienti con e senza la mutazione.

Il nostro studio è basato su pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica mediante un procedimento restrittivo e malassorbitivo e non solo restrittivo come nel caso dei due lavori sopracitati. Nel nostro studio non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i pazienti con e senza mutazione per i geni INSIG2 e MC4R per quanto riguarda perdita di peso e

comorbidità associate all'obesità patologica, ad eccezione del valore sopracitato per l'emoglobina glicata della popolazione affetta da mutazione INSIG2 e già commentato.

Come già detto i soggetti con mutazione del gene MC4R sono affetti da iperfagia. Sono già in atto studi su cavie per trovare una molecola agonista di tale recettore che permetta di diminuire tale iperfagia. Nel Giugno 2010 viene pubblicato uno studio su vari agonisti selettivi del recettore MC4 basati sull'amido di spiroindane; tale studio dimostra una riduzione significativa dell'introito calorico e perdita di peso delle cavie(58).

Conclusioni:

Lo studio ha permesso di determinare e confermare i dati della letteratura della frequenza di mutazioni dei suddetti geni in una popolazione affetta da obesità patologica e sottoposta a by-pass gastrico, e di verificare l'influenza di queste mutazioni sulle comorbidità inerenti all'obesità patologica e sul dimagrimento post-operatorio a breve e lungo termine.

La semplicità della metodica ci permette di immaginare uno scenario estremamente riproducibile per tutte le mutazioni che influenzano il peso corporeo.

Le mutazioni dei geni INSIG2 e MC4R non influenzano il calo ponderale di pazienti sottoposti a by-pass gastrico.

Lo studio conferma l'altissima efficacia del by-pass gastrico sulle comorbidità associate all'obesità patologica, soprattutto sul diabete di tipo

II.

Questo è il primo studio genetico che prende in considerazione il by-pass gastrico come tecnica chirurgica.

Il nostro studio insieme alla revisione della letteratura, sottolineano sia le enormi risorse che si stanno utilizzando nello studio dell'obesità per individuarne le cause genetiche, giungendo già a soluzioni pratiche nel caso dell'obesità monogenica causata dalle mutazioni del gene MC4R con la sintesi di un agonista efficace sull'iperfagia e quindi sul peso corporeo,

sia l'importanza della chirurgia bariatrica che ha un'altissima efficacia sui pazienti obesi affetti o non da mutazioni genetiche associate ad obesità patologica ed è ancora la sola cura a lungo termine per l'obesità patologica.

Prospettive future:

la corrispondenza tra variazione genetica e riscontro clinico (dietologico-psicologico) di un atteggiamento di iperfagia, in cui la mutazione può essere un marker sicuro per l'identificazione di pazienti con un sicuro comportamento alimentare, potrà in futuro essere da stimolo per analizzare separatamente i risultati a lungo termine di questa popolazione.

La popolazione dei pazienti obesi non è omogenea, il comportamento alimentare diverso, la diversa comparsa e timing delle co-morbidità, la diversa risposta alle tecniche restrittive, i fallimenti a lungo termine, l'identificazione di pazienti che possono a lungo termine andare incontro ad un fallimento sono oggetto di ricerca per cercare di caratterizzare dei

gruppi omogenei anche dal punto di vista dell'espressività genetica, dato certo ed immutabile.

La rilevanza clinica e la ricaduta sull'algoritmo terapeutico rimane un interessante e stimolante punto per la continuazione della ricerca.



By-pass gastrico transmesocolico retrogastrico

TABELLA 1 – CLASSI OBESITA’

IMC 30-35	Obesità lieve – I classe
IMC 35-40	Obesità moderata - II classe
IMC > 40	Obesità grave o patologica - III classe

TABELLA 2 - MUTAZIONI MC4R

p.Val103Ile	5pz
p.Ile251Leu	1pz
Delezione GA (Leu250-TTG)(Ile251-ATC)	1pz
p.Asp90Tyr	1pz
p.Asp298Asn	1pz

TABELLA 3 - COMPORTAMENTO ALIMENTARE

	M-	M+	INSIG2	MC4R
Binge eater	40%	50%	47%	56%
Sweet eater	51%	62%	59%	67%
Volume eater	84%	81%	82%	78%
B+S+V	28%	31%	24%	44%

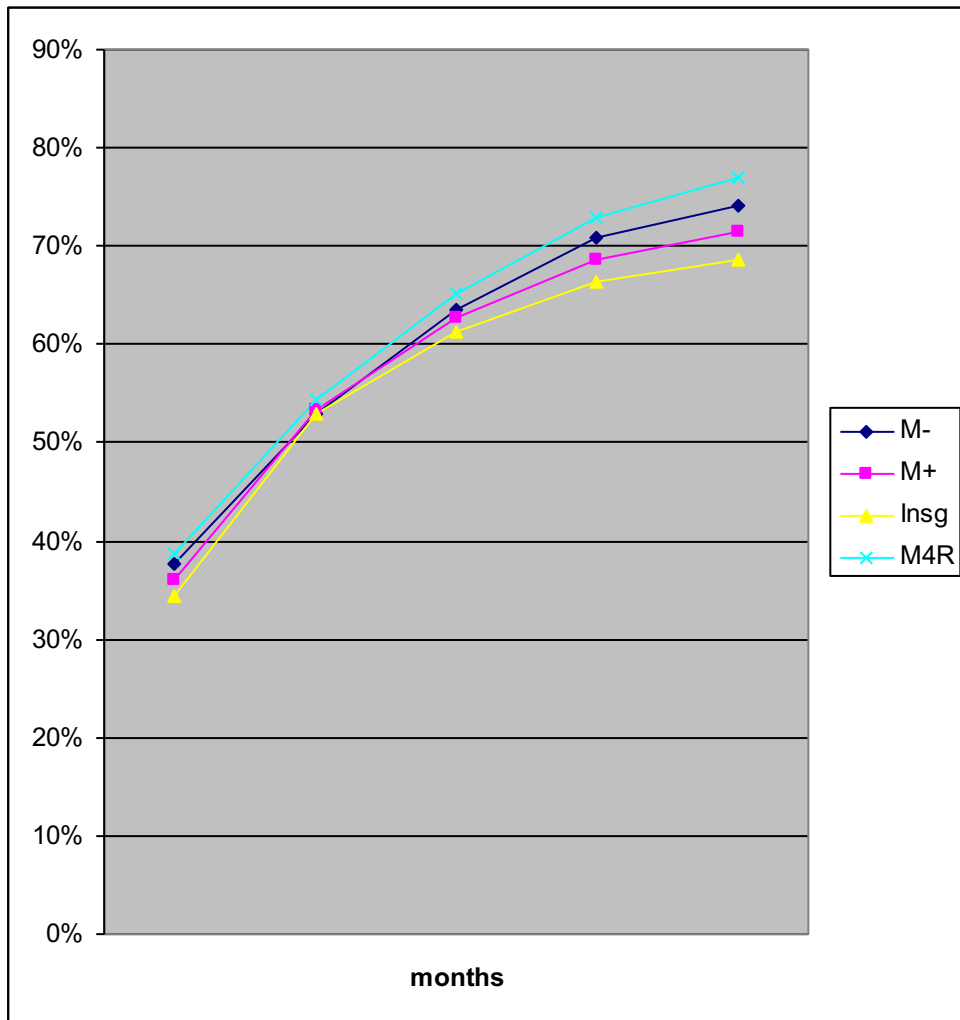


GRAFICO CURVE DIMAGRIMENTO



TABELLA IV - IPERTENSIONE ARTERIOSA

	M-	M+	INSIG2	MC4R
Pre-op	31%(50pz)	46%(12pz)	59%(10pz)	22%(2pz)
Miglioramento	44%(22)	58%(7)	50%(5)	100%(2)
Guarigione	50%(25)	42%(5)	50%(5)	0%
	M+G 94%	M+G 100%	M+G 100%	M+G 100%

TABELLA V - DIABETE

	M-	M+	INSIG2	MC4R
Pre-op	19%(32pz)	27%(7pz)	35%(6pz)	11%(1)
Miglioramento	34%(11)	14%(1)	17%(1)	0%
Guarigione	64%(20)	71%(5)	67%(4)	100%(1)
	M+G 97%	M+G 86%	M+G 83%	M+G 100%

TABELLA VI - EMOGLOBINA GLICATA

	M-	M+	INSIG2	MC4R
Pre-op >6.0%	27%(45pz)	46%(12pz)	59%(10pz)	22%(2pz)
Post-op <6.0%	62%(28)	75%(9)	80%(8)	50%(1)

TABELLA VII - COLESTEROLO-TRIGLICERIDI

	M-	M+
Pre-op Col>220 mg/dl	24%	19%
Post-op Col<220 mg/dl	60%	40%
Pre-op Tgl>200 mg/dl	19%	23%
Post-op Tgl<200 mg/dl	81%	67%

TABELLA VIII – RISULTATI STATISTICI-

VALORI DI  $p$

	M+	MC4R	INSIG2
EWL	0.37	0.64	0.14
Diabete	0.87	0.43	0.92
HbA1C	0.13	0.49	0.02
Ipertensione	0.18	0.43	0.07
Colesterolo	0.92	0.22	0.46
Trigliceridi	0.66	0.7	0.76

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, et al. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and eterogeneous cause of morbid obesity. J Clin Invest 2000; 106: 253-262.
- 2) National Institute for Health and Clinical Excellence. Obesity: the prevention, identification, assessment and management of overweight and obesity in adults and children. 2006; Clinical guideline 43.  
[www.nice.org.uk/CG43](http://www.nice.org.uk/CG43)
- 3) Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factor,2001. JAMA 2003; 289: 76-9.
- 4) Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke. Body-mass index and cause-specific mortality in 900000 adults:

collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373: 1083-96.

5) Mark AL. Dietary therapy for obesity: an emperor with no clothes. *Hypertension* 2008; 51: 1426-34; discussion 1434.

6) Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. Obesity. *N Engl J Med* 1997; 337: 396-407.

7) Colquitt JL, Picot J, Loveman E, Clegg AJ. Surgery for obesity. *Cochrane Database Sys Rev* 2009; (2): CD003641.

8) Katsanis N, Lupski JR, Beales PL. Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2293-9.

9) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.

[Erratum, *Nature* 1995; 374: 479]

- 10) Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, et al. leptin modulates the T-cell immune response and reverse starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901.
- 11) Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-8.
- 12) Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998; 18: 213-15.
- 13) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269: 546-9.
- 14) Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269:543-6.

- 15) Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-3.
- 16) Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341: 879-84.
- 17) Farooqi IS, Matarese G, Loed GM, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T-cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Investig* 2002; 110: 1093-103.
- 18) Farooqi JS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in human. *Annu Rev Med* 2005; 56: 443-458.
- 19) Gantz I, et al. Molecular cloning, expression, and gene localization of fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 15174-15179.

20) Sundaramurthy D, Campbell DA, Leek JP, Markham AF, Pieri LF.

Assignment of melanocortin 4 receptor (MC4R) gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridisation and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82: 97-98.

21) Huszar D, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4-receptor results

in obesity in mice. *Cell* 1997; 88: 131-141.

22) Yeo GS, Lank EJ, Farooqi IS, Keogh J, Challis BG, O'Rahilly S.

Mutations in the human melanocortin receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 561-574.

23) Gong Y, Lee JN, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Juxtamembranous

aspartic acid in Insig-1 and Insig-2 is required for cholesterol homeostasis.

*Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6154-6159

- 24) Lee JN, Gong Y, Zhang X, Ye J. Proteasomal degradation of ubiquitinated Insig proteins is determined by serine residues flanking ubiquitinated lysines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4958-4963.
- 25) Lee S, Lee DK, Choi E, Lee JW. Identification of a functional vitamin D response element in the murine Insig-2 promoter and its potential role in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 399-408
- 26) McPherson R, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 201-211.
- 27) Cervino AC, Li G, Edwards S, Zhu J, Laurie C, Tokiwa G, et al. Integrating QTL and high-density SNP analyses in mice to identify Insig2 as a susceptibility gene for plasma cholesterol levels. *Genomics* 2005; 86: 505-517.



28) Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, et al. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 2006; 312: 279-283.

29) House of Commons Health Committee. Obesity. Third report of session 2003-2004.

Volume 1. 2004. [www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmhealth/23/23.pdf](http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmhealth/23/23.pdf)

30) Micciolo R, Di Francesco V, Fantin F, Canal L, et al. Prevalence of overweight and obesity in Italy (2001-2008): is there a rising obesity epidemic. *Ann Epidemiol* 2010; 20: 258-264.

31) Wang Y, Lobstein T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes* 2006; 1: 11-25

32) Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF. Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 653-658.

33) Steffen LM. Eat your fruit and vegetables. Lancet 2006; 367: 278-279

34) WHO Europe. 10 things you you need to know about obesity (2006).

[WWW document]. URL

[http://www.euro.who.int/publications/pub/20060221\\_1](http://www.euro.who.int/publications/pub/20060221_1) (accessed june 2007).

35) Binkin N, Fontana G, Lamberti A, Cattaneo C, et al. A National survey of the prevalence of childhood overweight and obesity in Italy. Obes Rev 2010; 11: 2-10.

36) Cairella G, Casagni L, Lamberti A, Censi L. prevalenza di sovrappeso ed obesità in Italia nella fascia di età 6-11 anni. Ann Ig. 2008; 20: 315-327.

37) Albertini A, Tripodi A, Fabbri A, Mattioli M, et al. Prevalence of obesity in 6-and 9-year-old children living in Central-North Italy. Analysis of determinants and indications of risk of overweight. Obes Rev 2008; 9: 4-10.

- 38) Neovius M, Sundstrom J, Rasmussen F. Combined effects of overweight and smoking in late adolescence on subsequent mortality: nationwide cohort study. *BMJ* 2009; 338: 1-8.
- 39) Hinney A, Hebebrand J. Polygenic obesity in humans. *Obesity Facts* 2008; 1: 35-42.
- 40) Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, et al. Several mutation in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshit mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1483-1486
- 41) Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, et al. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutation are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4258-4267.
- 42) Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, et al. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations

in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1761-1769.

43) Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, et al.

Melanocortin 4 receptor mutation in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1811-1818.

44) Dempfle A, Hinney A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, et al. Large

quantitative effect melanocortin 4 receptor gene mutations on body mass index. *J Med Genet* 2004; 41: 795-800.

45) Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, Tounian

P, Levy-Marchal C, Buzzetti R, Pinelli L, Balkau B, Horber F, Bougnères

P, Froguel P, Meyre D. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-

4 receptor protect against obesity: the two facets of Janus obesity gene.

*Hum Mol Genet* 2007; 16: 1837-44

- 46) Dina C, Meyre D, Samson C, Tichet J, Marre M, Jouret B, Charles MA, Balkau B, Froguel P. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):187
- 47) Kumar J, Sunkishala RR, Karthikeyan G, Sengupta S. The common genetic variant upstream of INSIG2 gene is not associated with obesity in Indian population. *Clin Genet*. 2007 May;71(5):415-8
- 48) Roskopf D, Bornhorst A, Rimbach C, Schwahn C, Kayser A, Krüger A, Tessmann G, Geissler I, Kroemer HK, Völzke H. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):187; author reply 187.
- 49) Skelly T, Pinheiro AP, Lange LA, Sullivan PF. Is rs7566605, a SNP near INSIG2, associated with body mass in a randomized clinical trial of antipsychotics in schizophrenia? *Mol Psychiatry*. 2007 Apr;12(4):321-2.

50) Loos RJ, Barroso I, O'rahilly S, Wareham NJ. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):187.

51) Franks PW, Jablonski KA, Delahanty LM, McAteer JB, Kahn SE, Knowler WC, Florez JC; Diabetes Prevention Program Research Group. Assessing gene-treatment interactions at the FTO and INSIG2 loci on obesity-related traits in the Diabetes Prevention Program. *Diabetologia*. 2008 Dec;51(12):2214-23. Epub 2008 Oct 7.

52) Reinehr T, Hinney A, Nguyen TT, Hebebrand J. Evidence of an influence of a polymorphism near the INSIG2 on weight loss during a lifestyle intervention in obese children and adolescents. *Diabetes*. 2008 Mar;57(3):623-6. Epub 2007 Nov 14.

53) Andreasen CH, Andersen G. Gene-environment interactions and obesity--further aspects of genomewide association studies. *Nutrition*. 2009 Oct;25(10):998-1003. Epub 2009 Jul 12.

- 54) Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentes KU, et al. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J med* 2003; 348: 1096-103
- 55) Takanari G. binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 2003; 349: 606-610.
- 56) Peterli R, Peters T, von Flue M, Hoch M, Eberle AN. Melanocortin-4 receptor gene and complications after gastric banding. *Obes Surg* 2006; 16: 189-195
- 57) Sesti G, Perego L, Cardellini M, Andreozzi F, et al. Impact of common polymorphism in candidate genes for insulin resistance and obesity on weight loss of morbidly obese subjects after laparoscopic adjustable gastric banding and hypocaloric diet. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5064-5069.
- 58) He S, Ye Z, Dobbelaar PH, Sebhat IK, Guo L, Liu J, Jian T, Lai Y, Franklin CL, Bakshi RK, Dellureficio JP, Hong Q, Weinberg DH, Macneil

T, Tang R, Strack AM, Tamvakopoulos C, Peng Q, Miller RR, Stearns RA,  
Chen HY, Chen AS, Fong TM, Wyvratt MJ Jr, Nargund RP. Spiroindane  
based amides as potent and selective MC4R agonists for the treatment of  
obesity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Aug 1;20(15):4399-4405. Epub  
2010 Jun 15.