



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**POLMORFISMI DEI
RECETTORI DEL GUSTO E
SENSIBILITÀ GUSTATIVA IN
RELAZIONE AL BMI**

Relatore: Chiar.ma
ARIANNA VIGNINI

Tesi di Laurea di:
ENRICO CORINALDESI

Correlatore: Chiar.ma
SOFIA PUGNALONI

A.A. 2018/2019

INDICE

1 – INTRODUZIONE.....	2
OBESITÀ: DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA.....	3
CAUSE DELL’ OBESITÀ.....	4
Fattori ambientali.....	4
Fattori genetici.....	5
TECNICHE DI MISURA DELLA MASSA CORPOREA.....	6
IL GUSTO.....	9
Il sistema gustativo.....	11
Il gusto dolce.....	14
Il gusto amaro.....	15
POLIMORFISMI GENETICI E OBESITÀ.....	17
POLIMORFISMI E GUSTO.....	20
2 – SCOPO DEL LAVORO.....	22
3 – MATERIALI E METODI.....	24
CRITERI PER IL RECLUTAMENTO DEI SOGGETTI DELLO STUDIO.....	25
ESTRAZIONE DEL DNA.....	26
ANALISI SPETTROFOTOMETRICA.....	26
REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR).....	27
PCR allele specifica (ARMS).....	30
ELETTROFORESI.....	32
I gel di agarosio.....	33
ASSEGNAZIONE DEL GENOTIPO.....	35
TEST DEL GUSTO.....	35
4 - RISULTATI	37
5 – DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	41
6 – BIBLIOGRAFIA.....	44

1.INTRODUZIONE

OBESITÀ: DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

L'obesità è definita, dall'organizzazione mondiale della sanità (OMS), come una condizione di anomalo o eccessivo accumulo di tessuto adiposo nell'organismo, tale da rappresentare un rischio per la salute.

L'obesità può essere classificata in: essenziale, o primitiva, la più frequente (circa il 95% dei casi), dovuta ad un eccessivo introito calorico e ad un basso dispendio energetico, non attribuibile ad altre malattie, o secondaria, quando provocata da squilibri endocrini o dall'uso di farmaci (per es. in seguito a terapia cortisonica protratta). Sulla base dell'istologia invece, si può distinguere tra obesità iperplastica, dove si assiste ad un aumento del numero degli adipociti, fenomeno di prevalente insorgenza infantile, in cui il numero di cellule può essere cinque volte quello predeterminato, o ipertrofica, dove ad aumentare è il volume delle cellule adipose che in media può raggiungere oltre il 40% rispetto a quello della persona normale. Tuttavia la differenza tra le due forme non è sempre netta, in quanto entrambe condividerebbero l'aumento del volume degli adipociti e pertanto è più opportuno distinguere tra forme ipertrofico-iperplastiche e ipertrofiche pure. Infine, dal punto di vista morfologico, l'obesità essenziale è distinta in androide e ginoide. La prima, più frequente nell'uomo, è costituita da una più abbondante distribuzione di grasso in corrispondenza del tronco, della radice degli arti, della nuca, del collo e del viso. L'obesità ginoide, invece, più frequente nella donna ed è accompagnata da adipe flaccido in corrispondenza dei fianchi, dei glutei, delle cosce e delle gambe.

Il sovrappeso e l'obesità sono tra i principali fattori di rischio per le patologie non trasmissibili (Noncommunicable Diseases – NCDs), quali le malattie ischemiche del cuore, l'ictus, l'ipertensione arteriosa, il diabete tipo 2, le osteoartriti e alcuni tipi di cancro. Secondo l'OMS la prevalenza mondiale dell'obesità è quasi triplicata tra il 1975 e il 2016; più di 1,9 miliardi di adulti sovrappeso, di cui oltre 650 milioni obesi. Anche nei giovani l'eccesso ponderale è in continuo aumento; nel 2016 l'OMS contava più di 124 milioni di ragazzi obesi di età compresa tra i 5 e i 19 anni. In Europa ormai oltre il 50% della popolazione adulta è sovrappeso, a cui si aggiunge un 20% di obesi. Anche in Italia l'eccesso di ponderale è un problema preoccupante. Nel periodo 2001/2009, è aumentata sia la percentuale dei soggetti in sovrappeso (da 33,9% nel 2001 al 36,1% nel 2009) che quella dei soggetti obesi (da 8,5% nel

2001 a 10,3% nel 2009). La quota di popolazione in eccesso ponderale aumenta al crescere dell'età, passando dal 19% tra i 18 e i 24 anni a oltre il 60% tra i 55 e i 74 anni, per poi diminuire lievemente nelle età più avanzate (55,9% tra le persone con più di 75 anni). A livello territoriale si osserva che la condizione di sovrappeso ed obesità è più diffusa nel sud (50,9%) in particolare Molise (51,6%), Campania (51,8%) e Calabria (51,4%) e che sia inoltre più frequentemente correlata ad un basso livello socio-economico (Dati Istat, Interviste Multiscopo "Aspetti della vita quotidiana", anno 2009, www.epicentro.it).

CAUSE DELL' OBESITÀ

La maggior parte dei soggetti obesi rientra nel quadro della cosiddetta obesità essenziale, la cui eziopatogenesi non è ancora completamente chiarita, nonostante i progressi in fisiopatologia clinica e sperimentale. Gli studiosi concordano nel sottolineare l'obesità come la risultante della combinazione variabile di due elementi: la presenza di fattori ambientali/comportamentali che incidono per il 60-70% e la suscettibilità genetica, cioè la predisposizione genetica dell'individuo a diventare obeso, che incide per il restante 30-40%.

Fattori ambientali

L'eccessivo introito calorico rispetto alle necessità energetiche giornaliere e la scelta di uno stile di vita sedentario sono le cause più frequenti di obesità. L'iperalimentazione deriva da elevate palatabilità e disponibilità di alimenti ad alta densità energetica, mentre la sedentarietà è oggi favorita sia dalla diffusione di mezzi di trasporto e di lavori che non determinano un elevato dispendio energetico, che da una mancata "cultura dello sport" che ha portato ad una riduzione dell'attività fisica. L'inattività fisica è oggi considerata il quarto fattore di rischio di mortalità a livello mondiale, superata solo dall'ipertensione sanguigna e dal consumo di tabacco, e causa il 6% di tutti i decessi. (OMS 2014). Questi possono poi sommarsi a fattori culturali come una bassa scolarizzazione e quindi informazione, ma anche psicologici, facendo riferimento al cibo come elemento gratificante a fronte di situazioni di ansia, paura e insicurezza. Anche l'utilizzo di alcune classi farmaci può promuovere l'accumulo di tessuto

adiposo come farmaci ad azione centrale (antidepressivi, antipsicotici, sedativi) e farmaci steroidei.

Fattori genetici

Parallelamente ai fattori ambientali è innegabile che la componente genetica giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'obesità. Numerosi studi eseguiti su topo hanno mostrato l'importanza delle mutazioni di due geni che inducono l'obesità: i geni *ob* e *db* (Sirangelo TM. 2016).

Il gene *ob* è responsabile della sintesi della leptina nelle cellule del tessuto adiposo bianco, una proteina di 167 amminoacidi correlata alla famiglia delle citochine che agisce a livello del sistema nervoso centrale. Questa proteina è responsabile della riduzione dell'assunzione di cibo e del livello di insulina circolante e dell'aumento del dispendio energetico; di conseguenza, una mutazione di tale gene determina un aumento dell'appetito e una riduzione del dispendio energetico, con conseguente comparsa di obesità. Infatti, nei topi *ob/ob*, modelli animali caratterizzati da un difetto genetico che non permette la produzione di leptina biologicamente attiva (genotipo *ob/ob*, le lettere minuscole indicano che si tratta di una forma mutata) aumentano i valori del neuropeptide Y (NPY), antagonista della leptina che stimola l'assunzione di cibo, riduce la spesa energetica ed innalza l'insulina plasmatica (circuitto leptina – neuropeptide Y). Invece, il gene *db* codifica per il recettore della leptina e di conseguenza la sua delezione induce una severa obesità. Non a caso tutti i modelli di obesità umana studiati sono caratterizzati da iperleptinemia, Questi geni sono i più importanti attualmente riconosciuti nel favorire l'insorgenza dell'obesità e vengono infatti definiti come “geni maggiori inducenti obesità”.

Altri cosiddetti “geni maggiori” la cui mutazione può indurre obesità sono POMC (gene codificante per la pro-opiomelanocortina, una proteina prodotta a livello cerebrale e la cui sintesi è regolata dalla leptina), che ha una funzione molto importante nella regolazione dell'assunzione di cibo e la sua assenza determina iperfagia ed obesità grave fin dalle prime settimane di vita, il gene codificante per il Pro-ormone-convertasi 1, enzima implicato nel processamento della POMC producendo i leganti del recettore della melanocortina (MC-R)

quali l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e gli ormoni melanocitostimolanti (MSH) ed, infine, i geni codificanti per i recettori della melanocortina (Millington GW. 2007).

Recentemente, a seguito di uno studio dell'università di Chicago, è stato dimostrato che la precedente correlazione tra il gene FTO e obesità è mediata dal gene IRX3. Le mutazioni a carico di FTO infatti non sono responsabili dell'espressione di un prodotto anomalo, ma cadono nelle sequenze introniche (non codificanti) che interagiscono con il promotore di IRX3. I topi di laboratorio in cui IRX3 è deficitario o mancante nelle cellule dell'ipotalamo, sono più magri di quelli normali, a parità di dieta e di attività fisica (Smemo S et al. 2014)

TECNICHE DI MISURA DELLA MASSA CORPOREA

Ad oggi esistono diversi metodi per definire se un soggetto è obeso o meno ma quello più largamente diffuso è certamente l'indice di massa corporea o BMI (body mass index). Le origini del BMI risalgono ad Adolphe Quetlet, matematico e statistico belga nato a Bruxelles nel 1796, che, a seguito dei suoi studi sui dati antropometrici della crescita umana, concluse che il peso cresce con il quadrato dell'altezza, descrivendo per la prima volta, nel 1832, il rapporto tra le 2 misure. L'indice Quetlet, oltre un secolo dopo, è stato utilizzato come parametro di misura dell'obesità. Il nome Body Mass Index è stato introdotto dal fisiologo Ancel Keys nel 1972.

L'indice di massa corporea si calcola come il rapporto tra il peso espresso in chilogrammi e il quadrato dell'altezza espressa in metri. Quando questo rapporto è compreso fra 25 – 29,9 il soggetto si definisce sovrappeso; se invece il rapporto supera 29,9 allora indica una condizione di obesità che può avere diversi gradi di gravità:

- I grado (obesità moderata), con un BMI compreso fra 30 – 34,9;
- II grado (obesità severa), con un BMI compreso fra 35 – 39,9;
- III grado (obesità grave), con un BMI maggiore di 40

SCHEMA BMI

SITUAZIONE PESO	MINIMO	MASSIMO
OBESITA' GRADO. III	≥ 40	
OBESITA' GRADO. II	35	39.99
OBESISTA' GRADO I	30	34.99
SOVRAPPESO	25	29.99
REGOLARE	20	24.99
SOTTOPESO	16	19.99
GRAVE MAGREZZA		<16

Tabella 1.1: categorie di peso in base al BMI

Sebbene questo indicatore sia da una parte uno strumento affidabile e facilmente utilizzabile a livello clinico, dall'altra bisogna riconoscerne dei limiti. Il BMI non definisce la composizione corporea, in altre parole non discrimina tra tessuto muscolare e tessuto adiposo, ne tanto meno definisce come quest'ultimo si distribuisce. Il corpo umano è composto da due costituenti principali: la massa grassa (Fat Mass o FM) e la massa magra (Fat Free Mass o FFM); la prima è il peso del solo grasso dell'organismo (sottocutaneo e periviscerale) mentre la seconda rappresenta il peso di tutti gli altri componenti organici: minerale osseo, glicogeno epatico, proteine muscolari, sali minerali e soprattutto acqua, che da sola costituisce, in condizioni normali, circa il 73% della FFM totale. Nel caso di un soggetto che pratica culturismo si avrà un valore di BMI elevato anche se la quantità di massa grassa è trascurabile. Inoltre i soggetti con una statura inferiore ai 150 cm o superiore ai 200 cm presentano valori di BMI rispettivamente più elevati o più bassi, ma non sempre sono in sovrappeso o in sottopeso. Di conseguenza il BMI da solo non è in grado di identificare correttamente una condizione patologica e quindi è necessario l'ausilio di altri parametri come la misura della circonferenza addominale (CA). Per ottenere un valore corretto della CA, il

soggetto deve stare in piedi e la misurazione va eseguita alla fine di una regolare espirazione, senza comprimere la cute con il metro. Il metro va fatto passare per due punti precisi: il processo iliaco anteriore e superiore e il punto più basso della gabbia toracica. I valori dovrebbero essere inferiore ad 88 cm nella donna e 102 cm nell'uomo. La CA ci permette di definire la distribuzione dell'adipe nel corpo, parametro che interessa i medici ancor di più che della quantità. Il tessuto adiposo viscerale (VAT) o intra-addominale si localizza negli spazi tra organi interni quali fegato, intestino e reni ed è più pericoloso di quello che si accumula sui glutei o sulle gambe (grasso periferico) perché è maggiormente soggetto a lipolisi, il processo metabolico che determina il catabolismo dei grassi depositati e la loro liberazione nella circolazione portale. A livello epatico gli acidi grassi liberi costituiscono il substrato per la sintesi di trigliceridi, aumentando il rischio di patologie cardiovascolari, diabete di tipo 2, aterosclerosi e varie complicanze metaboliche. Numerosi studi scientifici eseguiti dai principali ricercatori sull'obesità a livello mondiale hanno mostrato che, soggetti aventi una circonferenza addominale superiore alla norma, pur in presenza di un BMI normale, presentano un rischio due volte superiore di contrarre diabete mellito tipo 2 rispetto a soggetti con circonferenza addominale nella norma. In un soggetto con BMI e circonferenza addominale elevati il rischio aumenta ancora di più fino anche a 12-14 volte rispetto a soggetti che non presentano alterazioni di tali parametri.

Un altro sistema di misurazione del grasso corporeo è la plicometria. Questa prevede l'impiego del plicometro come strumento di misura delle pliche cutanee in determinati siti corporei. Con il termine plica si intende lo spessore di una piega costituita dalla cute e dal relativo tessuto adiposo sottocutaneo. Generalmente si valutano: plica bicipitale, plica tricipitale, plica sovrailiaca e plica sottoscapolare. Grazie all'equazione di Durnin e Womersley dalla somma dello spessore delle quattro pliche si può definire la densità corporea. La forma dell'equazione:

$$D = c - m * \log S$$

D = densità corporea;

c, m = coefficienti che variano per sesso ed età;

S = somma dello spessore delle quattro pliche.

Dalla densità si risale alla massa grassa con l'equazione di Siri:

$$\% \text{ massa grassa} = (495/D-450)*100$$

Per la plicometria, come per tutte le misure antropometriche (peso, altezza e circonferenza) è necessario limitare l'errore legato al sistema di misurazione mediante la standardizzazione della misurazione, l'utilizzo di strumenti regolarmente calibrati e revisionati e con la verifica periodica dell'accuratezza e riproducibilità di strumenti e campioni.

Esistono anche altre tecniche di misurazione come la densitometria, o pesata idrostatica (si basa sul principio di Archimede secondo il quale un corpo immerso in un liquido subisce un'apparente perdita di peso equivalente al peso di liquido spostato) e metodiche ad ultrasuoni ed a risonanza magnetica (si basano sulla diversa composizione molecolare dei tessuti) che pur essendo molto affidabili sono ancora poco diffuse poiché richiedono personale specializzato e l'impiego di macchinari complessi e molto costosi.

IL GUSTO

La capacità di rilevare sostanze chimiche nell'ambiente esterno ha da sempre avuto un'importanza fondamentale per garantire la sopravvivenza e l'adattamento degli individui e delle specie. Tra i vari sensi, il gusto è quello che permette di riconoscere e selezionare il cibo e di evitare l'ingestione di sostanze tossiche. Inoltre, il gusto influenza in modo determinante l'appetibilità dei cibi, condizionando le abitudini nutrizionali di ciascun individuo.

Il gusto è uno dei cinque sensi corporei, determinato, principalmente, dall'interazione di alcune sostanze chimiche con specifici recettori situati in numerosi organelli, detti gemme gustative, raggruppati in gruppetti di 50-150 unità e accolti in papille distribuite in regioni particolari della lingua. Le principali e tradizionali classi qualitative del gusto sono: il dolce, l'amaro, il salato e l'acido.

Accanto a questi quattro sapori universali, ne è stato recentemente aggiunto un quinto, detto umami. Tale termine, che in lingua giapponese significa "delizioso", è associato alla presenza di alcuni nucleotidi e del glutammato. Quest'ultimo è ampiamente utilizzato, sottoforma di glutammato monosodico, nell'industria alimentare, dove trova largo impiego come esaltatore di sapidità (rappresenta un ingrediente tipico del dado da brodo); lo troviamo inoltre in quantità generose in certi formaggi stagionati (come il grana padano e il parmigiano reggiano), con la differenza che in questi prodotti si forma per interazione spontanea (naturale) dell'acido glutammico (un amminoacido) con il sodio del sale aggiunto (cloruro di sodio).

Negli ultimi anni è stato aggiunto anche il grasso tra i sapori fondamentali; un gruppo di ricercatori della Washington University School of Medicine ha infatti notato come gli acidi grassi nel cavo orale, determinati dall'idrolisi dei trigliceridi derivanti dai cibi, costituiscono forti stimoli gustativi, riconosciuti da recettori specifici, in particolare il CD36. (Abrumad NA. 2005).

Ancor più recentemente sono stati individuati recettori per un settimo gusto, l'acqua. È stato dimostrato che le cellule del recettore del gusto (TRC) sensibili all'acido, mediano anche le risposte dell'acqua. (Zocchi D et al. 2017).

Al di fuori di questi sette sapori fondamentali, tutti gli altri, definiti complessi, possono essere ricondotti alla combinazione di due o più basi del gusto, eventualmente associate a stimoli di altra natura. Questa suddivisione sensoriale non è netta ed il meccanismo fisiologico che porta alla percezione del gusto è qualcosa di più complesso; rappresenta infatti quell'insieme di sensazioni avvertite con i cinque sapori fondamentali, ma anche con altre sfere sensoriali, come ad esempio stimoli tattili, termici, chimici e soprattutto con la sensazione olfattiva retronasale, detta anche sensazione gustolfattiva.

Per alcuni gusti, ed in modo particolare per l'amaro, esisterebbero inoltre delle sottoclassi di sapori (è stata dimostrata l'esistenza di cinque tipi di amaro) e non dovremmo quindi sorprenderci se in un prossimo futuro la lista dei sapori base dovesse ulteriormente allargarsi. D'altronde, questo senso ha rappresentato una qualità corporea essenziale nella storia e nel

processo evolutivo dell'uomo. Grazie ad esso infatti possiamo distinguere la presenza di sostanze potenzialmente benefiche o tossiche (sapore amaro).

Per ogni stimolo gustativo esistono una soglia di percezione ed una soglia di riconoscimento del gusto. La soglia percettiva, inferiore rispetto a quella di riconoscimento, viene data dalla concentrazione minima in cui deve essere presente una specifica sostanza per poter stimolare i recettori gustativi, determinando una sensazione gustativa. Per soglia di riconoscimento si intende invece la concentrazione minima di sostanza che consente di identificare con sicurezza un sapore. Normalmente, quanto maggiore è la concentrazione, altrettanto maggiore è l'intensità gustativa percepita. Va comunque sottolineato che un tipo di sapore può essere determinato proprio in relazione alla concentrazione; si può fare l'esempio del sale da cucina, a bassa concentrazione viene percepito come dolce mentre ad alta concentrazione come amarognolo. Le soglie variano in relazione allo stimolo gustativo e in funzione della pericolosità o necessità; normalmente si riscontrano soglie di riconoscimento più basse nel caso dei sapori amari, in accordo con quanto sopra menzionato sulla funzione di monitoraggio della presenza di sostanze potenzialmente tossiche. Nella seguente tabella si riportano le soglie di riconoscimento e percezione di alcune sostanze gustative associate alle relative differenti sensazioni gustative:

Sensazione gustativa	Sostanza	Soglia di percezione	Soglia di riconoscimento
<i>Salato</i>	<i>NaCl</i>	0,00238 mM	0,00815 mM
<i>Acido</i>	<i>HCl</i>	0,179 mM	0,226 mM
<i>Dolce</i>	<i>Fruttosio</i>	0,266 mM	1,33 mM
<i>Amaro</i>	<i>Chinino cloridrato</i>	0,00399 mM	0,00475 mM
<i>Umami</i>	<i>MSG</i>	12,6 mM	2,07 mM

Tabella 1.2: soglie di percezione e riconoscimento di alcune sostanze

Il sistema gustativo

L'organo deputato alla sensibilità gustativa è la lingua, in particolare la mucosa che ne riveste la superficie dorsale. La mucosa della lingua è formata da un rivestimento pavimentoso stratificato, che risulta cheratinizzato presso l'apice della lingua e non cheratinizzato posteriormente. Al di sotto di esso vi è la lamina propria della mucosa, costituita da tessuto connettivo fibroso denso, ricco di vasi sanguigni e nervi. La lingua non possiede una sottomucosa, ma la mucosa è direttamente a contatto con i muscoli linguali.

Sulla mucosa dorsale della lingua si distinguono al microscopio (e alcune anche ad occhio nudo) quattro tipi di papille, ovvero proiezioni della mucosa linguale: le papille filiformi, le fungiformi, le foliate e le circumvallate. Tutte contengono calici gustativi, tranne le papille filiformi.

Le papille filiformi sono le più piccole e numerose della lingua, hanno una forma allungata (descritta come conica o cilindrica) disposte in direzione antero-laterale, parallela al solco terminale, che divide la porzione orale dalla porzione faringea della lingua. Strutturalmente sono escrescenze della lamina propria, contengono quindi un nucleo centrale di tessuto connettivo fibroso denso e sono ricoperte da tessuto epiteliale pavimentoso cheratinizzato. Sebbene non contengano calici gustativi, il loro numero e la loro ruvidità, permettono di intrappolare piccoli frammenti del cibo ingerito, facilitandone così sia la distribuzione agli altri tipi di papille che conferiscono la sensibilità gustativa, sia a spingerlo verso la faringe sotto forma di bolo alimentare.

Le papille fungiformi si trovano esclusivamente nella porzione orale della lingua e sono maggiormente concentrate sulla punta e sui lati. Hanno una forma simile ad un fungo e ciascuna di esse ha circa 3 calici gustativi, localizzati soprattutto all'apice;

Le papille foliate sono delle pieghe mucose di colore rosso, ben visibili anche ad occhio nudo, anch'esse costituite centralmente da tessuto connettivo fibroso denso ricoperto da epitelio pavimentoso non cheratinizzato. Si trovano ai lati della mucosa dorsale della lingua, dietro il solco terminale, quindi nella porzione faringea. Il loro epitelio contiene circa 3 calici gustativi per papilla che però per la maggior parte degenerano all'età di due o tre anni;

Le papille circumvallate (o vallate) sono le più voluminose, sono strutture cilindriche schiacciate di 1-2 mm di diametro, che si trovano appena davanti al solco terminale e formano una fila che segue il suo bordo a "V"; il loro numero varia da 8 a 12 ma contengono fino alla metà di tutti i calici gustativi (circa 250 ciascuna), localizzati sulla parete della papilla. La papilla vera e propria è circondata da un vallo circolare il quale si approfonda in direzione infero-mediale e che la separa da un rilievo circolare della mucosa, il vallo.

Il calice gustativo è una struttura cilindrica di $70\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ provvista di un poro gustativo e di un canale centrale descritta come "bottone gustativo" contenuta nell'epitelio e formata da un numero variabile da 40 a 60 cellule fusiformi. È isolato dalla lamina propria da una lamina basale. Gli assoni afferenti perforano la lamina basale e si spiralizzano attorno a ciascuna cellula sensitiva del bottone gustativo. In ogni bottone gustativo è possibile identificare tre tipologie cellulari: le cellule gustative, di sostegno e le cellule basali.

Le cellule gustative sono cellule epiteliali che contraggono sinapsi con le fibre nervose sensitive ed hanno dei microvilli apicali denominati peli gustativi, che funzionano da recettori di superficie per le molecole gustative. Le cellule di sostegno sono simili a quelle basali, ma sono prive di peli gustativi e di un ruolo sensitivo, mentre le cellule basali, sono cellule staminali che prendono parte al rapido turnover delle cellule del bottone gustativo (una cellula gustativa vive per soli 7-10 giorni) (Saladin SK. 2011).

Ancora oggi è importante sottolineare come sbagliato il modello della "mappa dei sapori", ovvero che esistano zone della lingua che recepiscono gusti differenti, teoria derivata da un errore di traduzione in inglese di un articolo tedesco. Nell'articolo si rilevavano solo piccole differenze nella soglia di percezione dei sapori in differenti regioni della lingua. Nel 1974 è stata ripresa la teoria originale, secondo la quale l'intera lingua è in grado di riconoscere tutti i sapori (figura 1.2).

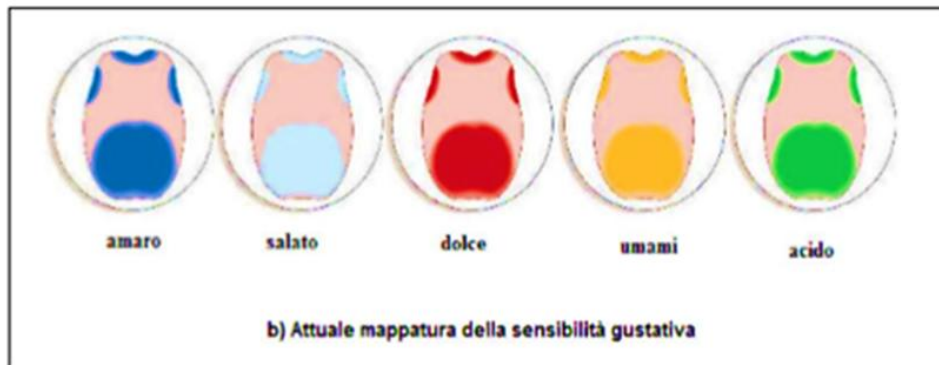


Figura 1.1: attuale mappatura della sensibilità gustativa

Il gusto dolce

Ogni persona sa bene quale piacere provoca la dolcezza dello zucchero, tantochè il desiderio di assunzione va spesso oltre i reali bisogni fisiologici essendo fortemente condizionato dal valore edenico di questa sostanza. Non possiamo comunque negare che la percezione del dolce aiuta a riconoscere fonti di energia metabolica basilari e fondamentali. I gusti con modalità attrattive, dolce e umami, vengono determinati da una piccola famiglia di tre recettori accoppiati alla proteina G (GPCRs, G-protein-coupled receptors) - T1R1, T1R2 e T1R3 (o TAS1R) - che sono lontanamente relazionati ai recettori metabotropici del glutammato, dei feromoni, del sensing del calcio extracellulare e degli acido- γ -amminobutirrico di tipo B (Nelson et al. 2002). Questi GPCRs si assemblano sia in complessi recettoriali omodimerici che eterodimerici (Pin e Acher, 2002), e sono caratterizzati dalla presenza di lunghi domini extracellulari amino-terminali, che sembrano indirizzare il riconoscimento ed il legame del ligando (lo zucchero o L-amminoacido) (Kunishima et al. 2000). I recettori T1Rs sono espressi in dei subsets di cellule recettoriali gustative (TRCs - taste receptor cells) coesprimenti il T1R1 ed il T1R3 (cellule T1R1+3), il T1R2 ed il T1R3 (cellule T1R2+3) e cellule TRCs contenenti solamente il T1R3. Volendo definire la funzione di queste cellule facciamo riferimento a studi genetici effettuati più di trenta anni fa sul gusto dolce di topi. Tali studi identificarono un locus singolo principale che influenzava le risposte a numerose sostanze dolci, localizzato nell'estremità distale del cromosoma 4 del topo (Fuller

JL, 1974; Lush IE, 1989). Questo locus, denominato Sac, determina differenti soglie di abilità di alcuni ceppi nel distinguere soluzioni contenenti saccarosio e/o saccarina nell'acqua pura. È stato dimostrato che il locus Sac codifica il recettore T1R3 (Kitagawa et al. 2001) e ciò implica il coinvolgimento di un membro della famiglia genica T1Rs nella rilevazione del gusto dolce. Altri studi di espressione funzionale in cellule eterologhe avevano dimostrato che il T1R3 combinato al T1R2 (T1R2+3) forma il recettore del gusto dolce che risponde a tutte le classi di stimoli gustativi dolci: zuccheri naturali, dolcificanti artificiali, D-amminoacidi e proteine intensamente dolci (monellina, miraculina, pentadina, curculina e taumatina) (Ravi K, 2005). Questi risultati convalidavano la funzione del recettore eterodimerico T1R2+3 come recettore del dolce e suggerivano che le cellule T1R2+3 sono il subset di TRCs sensibili al dolce. Prove definitive che il recettore T1R2+3 sia il principale recettore del gusto dolce nei mammiferi sono derivate da studi su topi knockout per il T1R2 e il T1R3. Mutanti omozigoti, mancanti le due subunità, mostravano una perdita devastante del gusto dolce, ed infatti vengono abolite tutte le risposte comportamentali ed elettrofisiologiche ai dolcificanti artificiali, ai D-amminoacidi e alle basse o moderatamente alte concentrazioni di zuccheri naturali (fino ai 300 mM). In ogni caso questi animali conservavano delle piccolissime risposte alle concentrazioni altissime di zuccheri. Una cosa importante da tenere presente è che il doppio knockout T1R2/T1R3 eliminava completamente le suddette risposte residue, dimostrando inequivocabilmente il ruolo essenziale dei T1Rs nella rilevazione e percezione del gusto dolce (Damak S et al. 2003). A corroborare la tesi che i T1Rs sono necessariamente richiesti nella percezione del gusto dolce ha provveduto la scoperta che i gatti (così come tutta la famiglia dei felidi, dal gatto comune alla tigre) presentano una delezione naturale nel loro gene T1R2, il che fornisce una spiegazione molecolare alla sorprendente osservazione che i gatti non rispondono al dolce (Li X et al. 2005).

Il gusto amaro

Il gusto amaro ha l'oneroso compito di prevenire l'ingestione di una grandissima quantità di composti tossici strutturalmente distinti che evocano la stessa sensazione conosciuto come amaro. Considerando la vastità di questo repertorio possiamo sottolineare la differenza tra il

gusto amaro e il dolce e l'umani, che invece si sono evoluti per riconoscere un numero limitato di nutrienti. Queste osservazioni suggeriscono che i recettori del gusto amaro vengono probabilmente codificati da una grande famiglia genica e la sensazione dell'amaro, evolutasi nel tempo, permette il riconoscimento di un ampio spettro di composti chimici pur non distinguendoli necessariamente uno dall'altro. L'amaro è mediato da una famiglia di circa trenta GPCRs altamente divergenti fra loro (i recettori T2Rs) (Adler E et al. 2000; Matsunami H et al. 2000). I geni T2R sono espressi selettivamente in subsets di cellule TRCs diverse e distinte da quelle che contengono i recettori del dolce e dell'umami e formano un cluster in regioni del genoma geneticamente collegate al gusto amaro sia nell'uomo che nei topi. È stato dimostrato che parte dei recettori T2Rs funzionano come recettori del gusto amaro e che parecchi hanno polimorfismi distintivi, associati a variazioni significative nella sensibilità a sostanze che stimolano in modo selettivo il gusto amaro. Prove certe del fatto che i T2Rs sono necessari e sufficienti per la funzionalità del gusto amaro provengono da studi di mis-espressione e topi knockout (Chandrashekar J et al. 2000; Behrenz M et al. 2004). Da una parte, animali nei quali manca uno specifico T2R (ad esempio il T2R5, recettore candidato della cicloesimide), esibivano una perdita selettiva e molto marcata dell'abilità percettiva del corrispondente composto amaro, dall'altra, topi geneticamente ingegnerizzati per esprimere il recettore umano candidato per il PTC (feniltiocarbammide) e la salicina, due sostanze amare alle quali il topo normalmente non risponde, divengono estremamente avversi a queste sostanze chimiche. Questi risultati dimostravano che i T2Rs sono necessari e sufficienti per la risposta selettiva alle sostanze che stimolano il gusto amaro e convalidavano che il ruolo dei T2Rs, e delle cellule che li esprimono, è quello di mediatori in vivo della rilevazione e percezione del gusto amaro. In ogni caso, il fatto che la risposta del topo al gusto amaro possa essere umanizzata introducendo recettori del gusto dell'uomo, mette in luce un'importante caratteristica dei recettori T2Rs, ovvero che le differenze in selettività e sensibilità ai composti amari tra le diverse specie sono probabilmente il riflesso della differenziazione delle sequenze geniche nel loro rispettivo repertorio di T2Rs. Una straordinaria caratteristica biologica dei recettori dell'amaro proviene dalla scoperta che la maggior parte, se non tutti i recettori T2Rs, vengono espressi nelle stesse cellule TRCs, e questo implica che cellule esprimenti T2Rs, potrebbero funzionare come un sensore ad ampio spettro per tutte le sostanze chimiche amare, con l'unico inconveniente che potrebbero avere limitata

discriminazione. Non sarebbe irragionevole immaginare che, sebbene gli animali possano rilevare molti composti amari, essi non hanno bisogno di distinguerli a livello qualitativo. Inoltre, ulteriori studi su topo hanno confermato che le cellule esprimenti T2Rs operano come sensori universali dell'amaro e che, sebbene topi e ratti possano distinguere intensità differenti di sostanze stimolanti il gusto amaro, essi siano incapaci di discriminarle (Mueller KL et al. 2005). Sarebbe irragionevole aspettarsi che differenti cellule TRCs rispondenti all'amaro esprimano le stesse proteine T2Rs a livelli identici; ne deriva che cellule individuali sensibili all'amaro probabilmente variano nella loro sensibilità alle sostanze stimolanti tale gusto ma continuano ad essere in grado di rispondere a tutto il loro repertorio.

POLIMORFISMI GENETICI E OBESITÀ

Per polimorfismo, in biologia, si intende la presenza di più alleli, (forme alternative di un gene) di uno stesso gene, nella popolazione di una specie, che si presentano con una frequenza maggiore dell'1%, determinando quindi la contemporanea esistenza di 2 o più fenotipi. Questi sono dovuti a mutazioni a carico del DNA che possono interessare tratti più o meno lunghi del genoma e, a seconda del tipo di mutazione, si possono distinguere diversi tipi di polimorfismi:

- *VNTR* (variable number of tandem repeats) o minisatelliti, polimorfismi in cui la differenza delle varianti è data dalla ripetizione in tandem di specifiche sequenze nucleotidiche, una di seguito all'altra. Hanno una lunghezza compresa tra le 20 e 100 bp e una distribuzione prevalentemente subtelomeric. In ogni individuo, questi polimorfismi basati sullo stesso motivo ripetuto possono comparire solo una volta o più volte nel genoma, con differenti lunghezze su differenti cromosomi. La distribuzione delle lunghezze delle ripetizioni viene utilizzato come marcatore. Le VNTR sono stati i primi dati delle sequenze genetiche ad essere utilizzati per l'identificazione personale, ovvero per la costruzione di impronte genetiche nelle cause di paternità e nelle cause penali;
- *RFLP* (restriction fragment length polymorphism), polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione. Questi sono stati i primi marcatori genetici basati direttamente su sequenze di DNA anziché su caratteri fenotipici. In questo caso il marcatore genetico è la

lunghezza dei frammenti di restrizione che contengono al loro interno una particolare sequenza. Questi si ottengono grazie all'azione di un'endonucleasi di restrizione che taglia il DNA a livello di una sequenza specifica, generalmente lunga 4, 6 o 8 bp;

- *STR* (short tandem repeats), sono sequenze ripetute di DNA non codificanti più corte dei minisatelliti (1-5 bp) ma ripetute molte volte (10 – 30 copie consecutive). Rispetto alle VNTR hanno una distribuzione più uniforme nel genoma umano;

- *SNPs* (single-nucleotide polymorphism), polimorfismi in cui la alterazione colpisce un singolo nucleotide e costituiscono il 90% delle variazioni genetiche umane. Possono presentarsi all'interno di una regione codificante di un gene, a livello di una regione intronica o in una intergenica. Lo studio degli SNP è molto utile perché questi possono influenzare lo sviluppo di patologie o la risposta ad agenti infettivi e farmaci. Effettuando, ad esempio, uno screening degli SNP presenti nel gene responsabile della metabolizzazione di un farmaco, si può conoscere l'effetto che avrà quel farmaco ancor prima di somministrarlo. Non sempre però la mutazione determina una variazione nella sequenza amminoacidica codificata, in quanto il codice genetico si definisce degenerato (o ridondante). Esistono infatti 64 (4 elevato alla terza) codoni (triplette di basi azotate) che codificano per 20 amminoacidi diversi e quindi un amminoacido può essere specificato da più di un codone (Arthur M.Lesk. 2014)

Gli SNP rappresentano uno dei tanti meccanismi adattativi della nostra evoluzione all'ambiente in cui viviamo e ne sono stati identificati oltre 10 milioni; di questi, i più comuni sono presenti dal 5 e fino al 50% della popolazione. Siamo di solito eterozigoti per circa 50.000 SNP nei nostri geni che producono alterazioni nell'espressione genica e modificazioni nella struttura e/o funzione delle proteine prodotte. Alcuni SNP sono relativamente comuni nella nostra popolazione e obbligano i portatori ad assunzioni specifiche di alcuni nutrienti. Ad esempio, la 5,10 - metiltetraidrofoloreduttasi (MTHFR) è un enzima coinvolto nel metabolismo dell'acido folico che presenta un'attività limitata in caso di omozigosi per il polimorfismo C677T e come conseguenza di ciò un corrisponde un aumento dell' omocisteina plasmatica che è associato ad un importante incremento del rischio cardiovascolare (Liew SC et al. 2015). In questi casi, l'assunzione di importanti quantità di folati permette di normalizzare i livelli di omocisteina. Un altro esempio è l'Apolipoproteina C3 (APOC3), che esercita un ruolo importante nel metabolismo dei lipidi, inibendo il metabolismo del triacil-

glicerolo ad opera dell'enzima lipoproteina-lipasi, con conseguente incremento del livello di trigliceridi nel sangue (ipertrigliceridemia). I polimorfismi C3175G e T3206G del gene APOC3 sono associati ad un rischio 4 volte superiore di ipertrigliceridemia e ad un elevato rischio di insorgenza di infarti, arteriosclerosi e patologie cardiovascolari. (Newman DL et al. 2004; Xu CF et al. 1994). La lipoproteina lipasi (LPL) è un enzima coinvolto nel metabolismo dei trigliceridi nelle lipoproteine circolanti. Questo enzima è sintetizzato dalle cellule del tessuto adiposo e muscolare e dopo essere secreto è trasportato sull'endotelio dei capillari, dove interagisce con le lipoproteine ricche in trigliceridi. L'LPL migliora l'assorbimento delle lipoproteine da parte del fegato e delle pareti dei vasi sanguigni. Il polimorfismo C1595G sembra avere un ruolo benefico in quanto è stato associato con un rischio diminuito di insorgenza di patologie cardiovascolari, ridotta pressione arteriosa e bassi livelli di trigliceridi. (Kobayashi et al., 1992).

Di interesse, inoltre, è un polimorfismo riscontrato in associazione al fenotipo obeso. A seguito di uno studio è stato dimostrato che il polimorfismo CC del gene INSIG (insulin-induced glycoprotein) si associa ad un BMI francamente aumentato rispetto alle varianti GG e GC (Herbert A et al. 2006)

Per quanto riguarda il peroxisome proliferator-activated receptors (PPARG) è noto il polimorfismo Pro12Ala. Il PPARG è un recettore che notoriamente svolge un ruolo importante nella stimolazione del processo naturale del corpo alla base della regolazione del metabolismo lipidico e dei carboidrati, aumentando la sensibilità all'insulina. Alcuni studi supportano un ruolo benefico del polimorfismo Pro12Ala, che è associato con una ridotta trascrizione del gene PPARG2. Tale polimorfismo, inoltre, è associato a una diminuzione del BMI, riduzione dei livelli di insulina, aumento dei livelli di HDL e migliorata sensibilità all'insulina. Quindi, il polimorfismo Pro12Ala diminuirebbe il rischio di DM2 (Stumvoll M. et al 2002). Tuttavia il suo ruolo non è ancora chiaro se si considerano anche i dati che derivano da altri studi, che suggeriscono tale polimorfismo come un fattore di rischio per l'obesità (Yao YS et al. 2015)

POLIMORFISMI E GUSTO

Recenti studi hanno evidenziato l'importanza che le mutazioni genetiche nei recettori gustativi hanno nel guidare le scelte alimentari, influenzando, quindi, il peso corporeo. Uno studio italiano ha investigato il legame tra il BMI e tre SNPs (P49A rs713598; A262V rs1726866; V296I rs10246939) del recettore del gusto amaro TAS2R38 (localizzato nel cromosoma 7), il più studiato, codificante per una proteina G-accoppiata transmembrana che lega la tiourea, molecola presente nei glucosinolati (grande famiglia di composti amari distribuite nelle piante di Brassica sp.), e composti sintetici come fenitiocarbamide (PTC) e 6-n-propiltiouracile (PROP). Esistono infatti una variante allelica taster (PAV) ed una non-taster (AVI) che sono alla base dei fenotipi taster (PAV/PAV o PAV/AVI) e non taster (AVI/AVI). Il fenotipo taster può ulteriormente suddividersi in due sottogruppi: medium-taster (PAV/AVI), che percepisce con moderata intensità PTC/PROP, e super-taster (PAV/PAV) che invece percepisce questi composti come estremamente amari. Lo studio ha rilevato una forte associazione tra il fenotipo non-taster ed una maggiore adiposità nelle donne (Tepper BJ et al. 2008). Interessanti sono le osservazioni che correlano le variazioni di TAS2R38 con la preferenza verso i cibi dolci. Uno studio in Giappone ha investigato l'associazione tra i polimorfismi P49A/I296V ed altezza, peso, BMI e assunzione di cibi energetici su 84 ragazze di età compresa tra i 18 e 21 anni. I risultati hanno dimostrato che gli individui con un genotipo omozigote AI (non-taster) erano più alti e pesanti rispetto a quelli con un genotipo PV (taster), mentre i valori di BMI erano simili tra i due gruppi. Il primo gruppo inoltre presentava un introito maggiore di cibi energetici e carboidrati (Inoue H et al. 2013). Tuttavia, il ruolo di questo fenotipo nel preferire cibi dolci rimane controverso, dato che alcuni studi non hanno dimostrato questa associazione. Ad esempio, uno studio condotto in Malesia, ha esaminato l'associazione tra il polimorfismo P49A e l'avversione per una lista di 36 vegetali, 4 prodotti di soia, the verde e 37 prodotti grassi/dolci senza però trovare differenze significative tra scelte alimentari, BMI e i tre genotipi (PA, PP, AA) (Ooi SX et al. 2010).

Un altro recettore ampiamente studiato per il suo legame con l'insorgenza dell'obesità è quello del gusto dolce, codificato dai geni TAS1R2 e TAS1R3, localizzati nel cromosoma 1. Le variazioni di questi geni sono state in parte descritte, ma le conseguenze funzionali di tali variazioni per la percezione del gusto dolce sono ancora sconosciute. Uno studio del 2010 ha

dimostrato che variazioni genetiche del gene TAS1R2 (Ser9Cys e Ile191Val) sono in grado di determinare l'eccessivo consumo di zucchero contribuendo all'aumento del peso corporeo. Sono state considerate 2 popolazioni: una di 1037 giovani adulti senza diabete ed un'altra di 100 individui con DM2, poi confrontate mediante consulenza dietetica. In entrambe le popolazioni è stata individuata una correlazione tra le varianti Ile191Val ed il BMI: gli individui omozigoti per l'allele Val consumano meno zuccheri rispetto alla controparte omozigote per l'allele Ile (Eny KM et al. 2010). La stessa conclusione è stata riportata da uno studio che ha indagato se le varianti dei geni TAS1R2 (Ile19Val – rs35874166) e TAS1R3 (-1266 C/T – rs35744813) influenzino l'apporto di cibo e di conseguenza lo stato nutrizionale di 312 bambini di età inferiore ai 7 anni. I soggetti con un genotipo omozigote Val/Val per il recettore TAS1R2 ingeriscono meno zuccheri rispetto ai bambini Ile carriers (Melo SV et al. 2017). Non è stata evidenziata alcuna associazione tra il polimorfismo 1266 C/T del recettore TAS1R3 con assunzione di cibo. Al contrario, una ricerca in Messico ha invece dimostrato l'esatto opposto delle precedenti dichiarazioni a riguardo del recettore TAS2R2: considerando sempre il polimorfismo Ile191Val, i soggetti con genotipo Val/Val mostravano un'assunzione in carboidrati, fibre, cereali e ortaggi più elevata rispetto ai genotipi Ile/Val o Val/Val (Ramos-Lopez O et al. 2016). Come per il gusto amaro non si è ancora arrivati ad una verità univoca, ma anche in questo caso i dati sembrano essere controversi.

Un'indagine più approfondita sul recettore TAS1R3 è stata condotta da uno studio secondo il quale due SNPs (C-1572-T rs307355/C-1266-T rs35744813), situati a monte della regione di codifica del gene, sono fortemente correlati alla sensibilità per il saccarosio. L'allele T di ciascun SNPs determina una ridotta attività del promotore rispetto agli alleli C ed è associato ad una ridotta sensibilità verso il saccarosio. (Fushan AA et al 2009). Ad ogni modo, gli studi associati ai polimorfismi di TAS1R3 e le rispettive variazioni nella sensibilità al gusto dolce sono ancora limitati.

2. SCOPO DEL LAVORO

In questi ultimi anni il problema obesità è divenuto sempre più importante e diffuso a livello mondiale, come risultato dei cambiamenti dello stile di vita. In termini di incidenza mondiale, l'aumento di peso e l'obesità sono in aumento sia nel mondo in via di sviluppo, sia nei Paesi sviluppati. Negli ultimi venti anni il tasso di obesità è triplicato nei Paesi in via di sviluppo di pari passo con l'aumento dell'urbanizzazione e con l'acquisizione di uno stile di vita occidentale correlato ad un apporto calorico più elevato e ad una vita più sedentaria. L'obesità è quindi diventata uno dei principali problemi di salute che minacciano il mondo di oggi. La sensibilità gustativa, come essa possa influenzare il comportamento alimentare e di conseguenza la massa corporea, è stata intensamente studiata per cercare di comprendere i fattori promuoventi l'obesità.

Grazie ai recettori presenti sulla superficie delle cellule epiteliali specializzate, localizzate nei bottoni gustativi, siamo in grado di distinguere i diversi gusti.

Numerosi sono i geni che codificano per i recettori del gusto amaro. In particolare nell'uomo sono stati identificati una famiglia di 25 geni, detti T2Rs o TAS2Rs, localizzati sui cromosomi 12, 7 e 5. Età, sesso, etnia influenzano la percezione dell'amaro: il recettore dell'amaro T2R38 ha un polimorfismo genetico che distingue *taster*, da *non-taster* e da *super-taster* dell'amaro. Gli individui che hanno un polimorfismo nel sito A49P del gene TAS2R38, che sostituisce nella proteina una prolina con una alanina, hanno diversa sensibilità all'amaro. I gusti dolce e umami sono invece percepiti da recettori appartenenti alla famiglia T1R o TAS1R. In particolare il recettore per il gusto dolce è costituito dal dimero formato da T1R2 e T1R3.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di capire se variazioni genetiche dei recettori gustativi, influenzando la sensibilità gustativa, possano determinare un aumento dell'introito calorico favorendo l'insorgenza dell'obesità. Siamo andati a determinare sperimentalmente la possibile esistenza di una relazione tra la percezione dei quattro sapori fondamentali, sapore grasso e sapore acqua con i polimorfismi a singolo nucleotide dei recettori del gusto amaro (TAS2R28) e dolce (TAS1R3), andando ad analizzare la frequenza degli alleli mutanti o wildtype in proporzione alle risposte corrette derivanti dal riconoscimento dei differenti stimoli gustativi (Test del gusto).

3. MATERIALI E METODI

Lo studio sui polimorfismi dei recettori del gusto si è stato articolato nelle seguenti fasi:

- collezione dei tamponi salivari dai soggetti partecipanti allo studio;
- estrazione del DNA genomico dai tamponi salivari recuperati;
- analisi spettrofotometrica del DNA estratto;
- amplificazione delle sequenze di interesse tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) allele specifica;
- elettroforesi in gel di agarosio;
- assegnazione del genotipo sulla base dei risultati ottenuti dalla PCR allele specifica.

CRITERI PER IL RECLUTAMENTO DEI SOGGETTI DELLO STUDIO

I soggetti coinvolti nello studio sono stati reclutati presso l'UOC di Dietetica e Nutrizione Clinica dell'Ospedale Regionale di Torrette e, dopo aver firmato il consenso informato, invitati a fornire il loro tampone salivare. Il campionamento è stato eseguito in:

- 57 pazienti normopeso (41F/16M; $20 < \text{BMI} < 25$);
- 85 pazienti sovrappeso/obesi (52F/33M; $\text{BMI} > 25$).

Tutti i pazienti erano affetti da sovrappeso/obesità di origine nutrizionale, mentre sono state escluse le forme di obesità secondarie.

Per ogni soggetto sono stati analizzati i seguenti SNPs:

- Recettore del gusto amaro (TAS2R38): A49P (rs713598); A262V (rs1726866)
- Recettore del gusto dolce (TAS1R3): C1572T (rs307355); G1266A (rs35744813)

I campioni, immediatamente dopo il prelievo, sono stati conservati a $+4^{\circ}\text{C}$ fino al momento della successiva fase di isolamento del DNA genomico.

ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA totale è stato estratto a partire dal pellet cellulare raccolto dall'estremità in cotone del tampone salivare, usando il kit "Genomic DNA from tissue" (Macherey - Nagel) che prevede l'impiego di dispositivi filtranti centrifughi. Le fasi del processo in successione:

- mettere il tampone in una provetta da 2ml. Aggiungere PBS (400 o 600µl) e 25µl di proteinasi K. Agitare e incubare a 56°C per 10';
- gettare il tampone e trasferire la soluzione in una provetta da 1,5ml;
- aggiungere il buffer B3, agitare vigorosamente e incubare a 70° per 10';
- aggiungere etanolo (400 o 600µl) e mixare con il vortex;
- mettere una "Nucleospin tissue column" (colonna dotata di filtro in silicio) in una "collection tube" (entrambe fornite dal kit) e trasferire 600µl della soluzione nella colonna. centrifugare a 11,000 x g per 1';
- gettare la provetta di raccolta con la soluzione filtrata e mettere la colonna con il filtro in una nuova collection tube;
- lavare la membrana di silicio aggiungendo 50µl di buffer B5 e centrifugando a 11,000 x g per 1'. Il lavaggio va fatto 2 volte;
- inserire la colonna con il filtro in una nuova provetta da 1,5ml e aggiungere 20µl di buffer BE per eluire il DNA. Centrifugare a 11,000 x g per 1'.

ANALISI SPETTROFOTOMETRICA

È stata effettuata un'analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto mediante l'impiego dello spettrofotometro. Più precisamente abbiamo utilizzato il nanodrop, spettrofotometro che permette di misurare il materiale con una piccolissima aliquota di campione, e misurato l'assorbanza a 260nm. La concentrazione del DNA estratto è legata al valore dell'assorbanza secondo la legge di Lambert Beer:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A = assorbanza (260nm);

ϵ = coefficiente di estinzione molare (50 per gli acidi nucleici a doppio filamento);

l = cammino ottico;

C = concentrazione della soluzione.

Lavorando con un materiale come il DNA è facile che questo venga contaminato da altre sostanze ed è quindi anche importante determinare la presenza di eventuali inquinanti nella soluzione. Facendo ad esempio il rapporto tra l'assorbanza a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}) si può valutare la presenza nella soluzione di proteine che interferirebbero con le fasi successive del nostro studio. Se il valore del rapporto è di $\sim 1,8$ il DNA può considerarsi puro. L'assorbanza a 230 nm, cioè ai margini dello spettro di assorbimento degli acidi nucleici, riflette la contaminazione del campione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici. Per campioni puri il rapporto A_{260}/A_{230} dovrebbe essere circa 2.2.

REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

La PCR è una tecnica di biologia molecolare utile per amplificare materiale genetico (DNA o RNA), inventata da Kary Mullis alla fine degli anni '80. Consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte. I principali reagenti per condurre una corretta analisi sono:

- template (DNA stampo a singolo filamento) contenente il frammento da amplificare;
- DNA polimerasi, enzima che copia la regione da amplificare. L'enzima attualmente più usato per la PCR è la Taq polimerasi, derivante dal batterio *Thermus aquaticus*, il quale ha una certa resistenza alla denaturazione (la sua emivita a 95° è di 40 minuti) ed è piuttosto processivo (incorpora 75 nucleotidi al secondo);
- primer, sequenze nucleotidiche abbastanza brevi che fungono da innesco per la DNA polimerasi. I primer sono usati in coppia: un forward ed un reverse. I primer della coppia non devono avere omologie tra loro; se uno si lega a sé stesso tramite sequenze palindromiche (omologie intra-molecolari, il primer si chiude su sé stesso) o all'altro primer per mezzo di sequenze omologhe inverse e complementari, si ottiene una riduzione della loro concentrazione;

- nucleotidi, generalmente utilizzati alla concentrazione di 200 μM ciascuno;
- magnesio, catione bivalente che si lega sia alla polimerasi per farla funzionare, sia al DNA per rendere più o meno agevole la denaturazione e il processo di annealing del primer. La concentrazione limite di magnesio sotto la quale non si può mai scendere è di 0.5 μM . Il valore medio di partenza che si utilizza è pari a 1.5 μM , ma di solito, per rendere un po' più processiva la polimerasi, si sale sui 2-2.5 μM (oltre i 2.5 μM i primer cominciano a legarsi in maniera aspecifica).

Il processo della PCR consta di tre steps principali, ripetuti dalle 25 alle 35 volte:

- *denaturazione* (94°C) della doppia elica di DNA in due singole eliche;
- *annealing* (50 – 60°C), fase durante la quale i primer si legano ai loro siti specifici del template. Più sono brevi, più la cinetica di appaiamento dei primer è rapida; allo stesso tempo, la breve lunghezza, comporta anche la possibilità che il loro legame possa essere inficiato da uno o più mismatch. I primer devono presentare un contenuto di G+C simile tra loro; la G si lega alla C, situata sul segmento complementare, attraverso tre ponti idrogeno, mentre la A e la T si legano tra loro tramite due ponti idrogeno. Ne deriva che il legame G-C ha un contenuto energetico maggiore, ed è quindi necessaria più energia per romperlo. Ciò condiziona la temperatura di annealing, per cui disegnando un primer con troppe o poche G e C, quest'ultimo avrà rispettivamente una temperatura di annealing eccessivamente alta o eccessivamente bassa rispetto all'altro. Esiste una formula che consente di determinare il valore ideale della temperatura di annealing basandosi sul calcolo della cosiddetta temperatura di Melting (temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA si trova in forma di doppia elica stabile ed il restante 50% in forma di singola elica):

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T);$$

- *estensione* (70 – 75°C), ovvero la polimerasi, iniziando dal primer, crea la nuova copia di DNA aggiungendo le basi, complementari al template, all'estremità 3'.

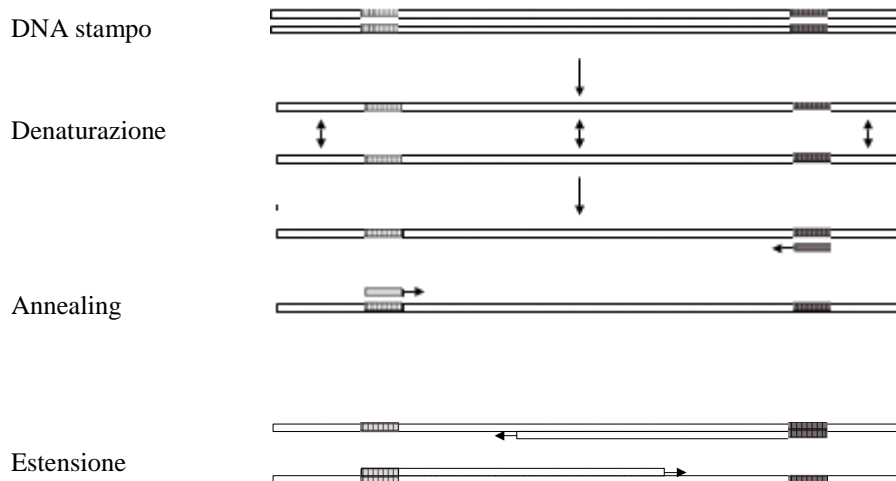


Figura 3.1: fasi della PCR

Il processo è compiuto automaticamente nel termociclatore, strumento programmato per passare alle diverse temperature richieste nei tempi previsti. Il numero dei cicli dipende dalla concentrazione iniziale del DNA bersaglio e ad ogni ciclo, teoricamente, si ha il doppio delle copie di DNA amplificato. In questo senso la duplicazione corrisponde alla massima efficienza (efficienza/ $E=1$), per cui ad ogni ciclo il numero di copie di quel determinato template è uguale a quello del ciclo precedente elevato a $[1 + E]$. Nella realtà l'efficienza non è mai pari a 1, ma un po' più bassa, il che determina che ad ogni ciclo non vengono replicate tutte le molecole. La prima fase della reazione procede con un'efficienza abbastanza lineare per alcuni cicli ed è definita fase esponenziale, dove si ha la massima efficienza possibile. Di seguito, quest'ultima comincia gradualmente a diminuire e la curva di reazione si appiattisce sempre di più; si parla di fase pseudo-lineare fino ad arrivare ad una situazione di plateau in cui la degradazione dei reagenti (dNTPs e DNA polimerasi) non favorisce più nessun aumento del numero di molecole (l'efficienza tende a 0).

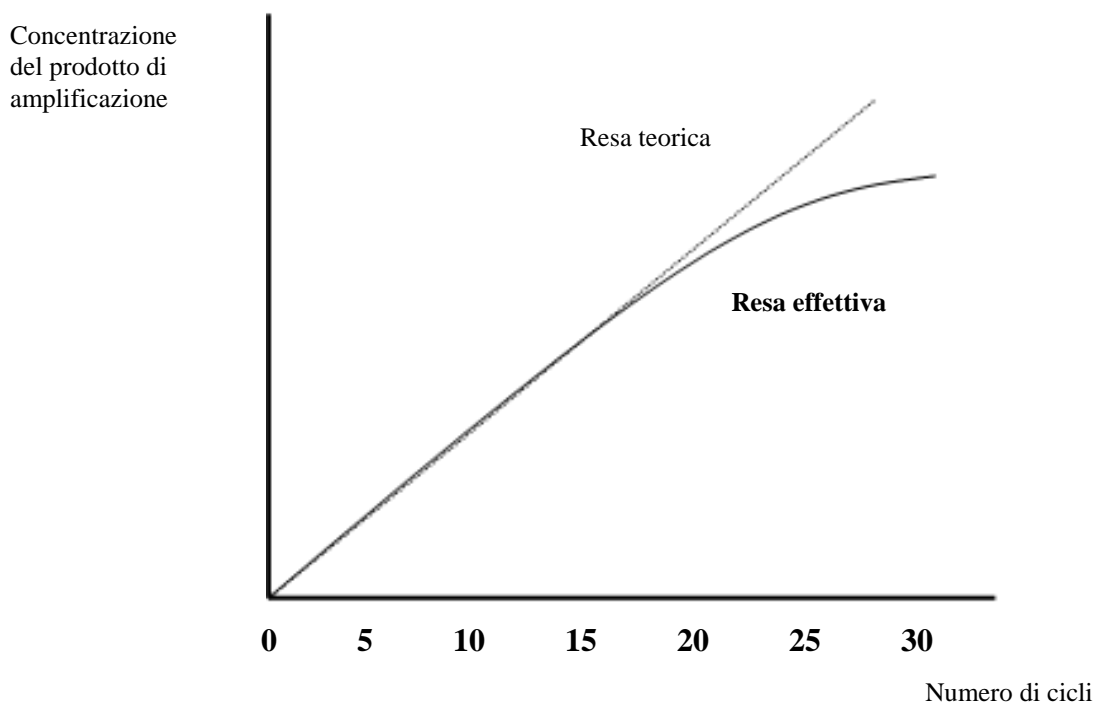


Figura 3.2: cinetica della reazione della PCR

PCR allele specifica (ARMS - PCR)

La PCR allele specifica, o ARMS – PCR (amplification refractory mutation system), è un metodo semplice ed economico che permette di analizzare i SNPs. A differenza di una normale reazione di PCR, prevede l'impiego di 2 forward: uno diretto verso l'allele wild type (WT), e l'altro verso l'allele mutato (M) (ARMS primer). Questi differiscono per un nucleotide all'estremità 3' che discrimina tra le due varianti alleliche. Il potere discriminante è dovuto anche grazie alla presenza di un mismatch, sempre in corrispondenza dell'estremità 3' (2 nucleotidi di distanza dal SNPs) che aumenta la specificità di reazione. Il reverse invece è lo stesso per entrambi gli alleli. Si allestiscono quindi due miscele di reazione per ogni campione, contenenti ciascuna un forward (WT o M) ed un reverse. Solitamente per essere sicuri che la PCR funzioni in maniera ottimale, si introduce uno standard interno che consiste di una coppia di primer non allele-specifica che amplifica una regione del genoma diversa da quella che contiene la mutazione. Si avrà così una seconda banda, corrispondente all'amplificazione dello standard interno che garantisce la perfetta esecuzione del saggio di PCR. Parallelamente è necessario l'utilizzo di un controllo negativo, ovvero una soluzione

priva del campione che se non risulta tale sta a significare che il prodotto di amplificazione è stato contaminato; esso non rappresenta una garanzia assoluta del fatto che il sistema non è stato contaminato, in quanto viene fatto correre ogni 10, 15 o 20 campioni e di conseguenza la probabilità che si contaminino proprio il controllo negativo piuttosto che uno qualsiasi degli altri campioni è bassa (di solito, quando si trova un controllo negativo contaminato significa che la contaminazione comincia ad essere frequente a tal punto da potersene accorgere; allo stesso tempo però, è possibile avere anche contaminazioni meno frequenti sui campioni, delle quali non ci si accorge perché il controllo continua ad essere negativo).

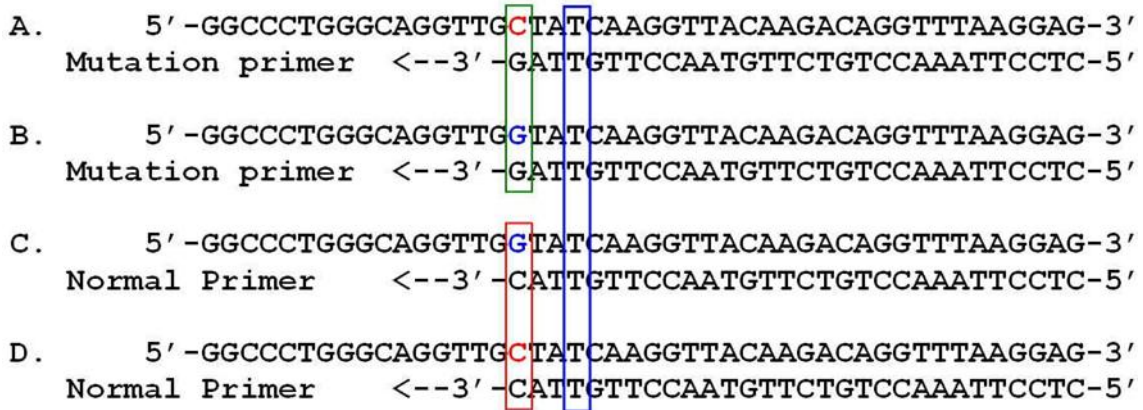


Figura 3.3: ARMS primer diretti contro l'allele normale e mutato:

- A. corretto appaiamento tra il primer e l'allele mutato (G-C), avviene l'amplificazione;
 - B. mismatch tra il primer e l'allele normale (G-G), non avviene l'amplificazione;
 - C. corretto appaiamento tra ARMS primer e allele WT (C-G), avviene l'amplificazione;
 - D. mismatch tra ARMS primer e l'allele mutato (C-C), non avviene l'amplificazione.
- In ognuno dei 4 casi è aggiunto un altro mismatch in prossimità dell'estremità 3' (T-T)

Le miscele di PCR, tutte con un volume totale di 15 μ l, sono state allestite come segue:

Componenti della miscela	Volume
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix 2X	7.5 μ l
Primer Forward/Reverse [5 μ M]	0.6 μ l
Primer Controllo Interno [5 μ M]	0.3 μ l
Primer allele mutante [5 μ M]	0.3 μ l
Primer allele selvatico [5 μ M]	0.3 μ l
DNA templatato	5 μ l (c.a 10ng)
Acqua sterile	1.3 μ l
Volume totale	15 μ l

Sono stati adottati gli stessi parametri di amplificazione per tutti i polimorfismi indagati:

Fase	Temperatura	Durata
Denaturazione iniziale:	95°C	3 min
Denaturazione:	95°C	20 sec
Annealing:	60°C	20 sec
Estensione:	72°C	20 sec
Estensione finale:	72°C	10min

ELETTROFORESI

È una metodologia di laboratorio che viene utilizzata per la separazione di molecole cariche in soluzione, molecole che migrano in modo differente in un campo elettrico in base al loro rapporto carica/massa (q/m) e alla loro forma: la velocità di migrazione è proporzionale al campo elettrico e inversamente proporzionale alle dimensioni della molecola. Quindi, molecole con carica simile ma di diverso peso molecolare (PM), e quindi con un diverso

rapporto q/m , presentano una migrazione differente se sottoposte ad un campo elettrico. Sono molte le molecole d'interesse biologico che possiedono gruppi ionizzabili e possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche, come ad esempio aminoacidi, peptidi, nucleotidi e acidi nucleici.

L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta, fondamentalmente, da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica, creando così una differenza di potenziale (d.d.p.) che determina il movimento delle molecole verso l'elettrodo di carica opposta: quelle cariche positivamente (cationi) verso il catodo (-), quelle cariche negativamente (anioni) verso l'anodo (+).

Perché l'elettroforesi abbia luogo, il campione deve essere disciolto in un tampone nel quale deve essere immerso l'eventuale supporto per consentire la conduzione della corrente. Il tampone serve, inoltre, per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole da separare, la cui carica varia naturalmente al variare del pH. Esistono diversi supporti:

- *filtro*;
- *gel*;
- *in fase liquida all'interno di capillari*.

Il supporto di elezione nei laboratori di biologia molecolare è il gel che, a seconda del tipo e della concentrazione della matrice usata, permette di ottenere un sistema con maglie di grandezza variabile e quindi una separazione in base al peso molecolare. La matrice può essere costituita da:

- *policrilamide*: per le molecole a basso PM (<5000 bp)
- *agarosio*: per le molecole ad alto PM (da 500 a 20 Kb)

I gel di agarosio

L'agarosio è un polisaccaride costituito da residui alternati di D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio, utilizzato per l'elettroforesi degli acidi nucleici più che per le proteine.

La velocità della migrazione elettroforetica degli acidi nucleici a doppia elica dipende da 4 principali parametri:

- la grandezza molecolare dell'acido nucleico. Molecole lineari a doppia elica corrono attraverso il gel ad una velocità inversamente proporzionale al log del loro peso molecolare;
- La concentrazione di agarosio. C'è una relazione lineare inversa tra il logaritmo della mobilità elettroforetica e la concentrazione del gel;
- La conformazione dell'acido nucleico che può essere lineare, superavvolto o circolare. La forma superavvolta è quella che ha una velocità di migrazione maggiore, mentre quella circolare è quella più lenta, perché più ingombrante. Il DNA lineare ha una velocità intermedia tra le due;
- il voltaggio applicato

I gel d'agarosio sono utilizzati orizzontalmente per via della scarsa consistenza del gel. Il metodo più conveniente per visualizzare il DNA nel gel è colorarlo col bromuro d'etidio (nome IUPAC: Bromuro di 3,8-diammino-5-etil-6-fenilfenantridinio). Questo composto contiene un gruppo planare che si intercala tra le basi del DNA. L'orientamento e la vicinanza dell'etidio alle basi fa sì che il colorante assuma una aumentata fluorescenza comparata a quella che ha quando è libero in soluzione. La radiazione U.V. a 254 nm è assorbita dal DNA e trasmessa al colorante legato: l'energia viene riemessa a 590 nm nella regione rosso-arancio dello spettro. Il colorante viene quindi visualizzato irradiando con raggi U.V. (ad esempio con un trans illuminatore): la sensibilità del rilevamento è solitamente migliore di 0.1 µg di DNA.

Dal momento che l'etidio è un agente intercalante, è un potenziale mutageno.

Una volta stabilito con cosa si colorano gli acidi nucleici, bisogna stabilire come giudicare il risultato dell'elettroforesi. Bisogna far sempre correre nell'elettroforesi un marcatore a peso molecolare, ossia una serie di molecole a dimensione nota detti pesi molecolari standard. Le dimensioni dei frammenti di DNA saranno identificate mediante il confronto con la migrazione sul gel di questi marker a peso noto. Misurando la distanza di migrazione dall'origine con i frammenti noti si ottiene una curva. Per interpolazione si possono definire le dimensioni dei frammenti ignoti.

ASSEGNAZIONE DEL GENOTIPO

I prodotti di amplificazione sono stati assoggettati a migrazione elettroforetica su gel di agarosio (2% agarosio in tampone di corsa 1X; 80 V, 1 ora di migrazione elettroforetica). La definizione del genotipo si basa sulla presenza/assenza del prodotto di amplificazione allele specifico. La presenza del prodotto di amplificazione relativo al solo allele normale è indice di un individuo omozigote per il nucleotide selvatico. La presenza del prodotto di amplificazione relativo al solo allele mutato è indice di un individuo che porta in omozigosi il nucleotide mutato. La presenza contemporanea dei prodotti di amplificazione relativi ai due alleli (normale e mutato) è sinonimo di un individuo che porta in eterozigosi il polimorfismo in esame. Le dimensioni dei frammenti ottenuti attraverso processo di amplificazione sono state assegnate per confronto con un marker di dimensioni note.

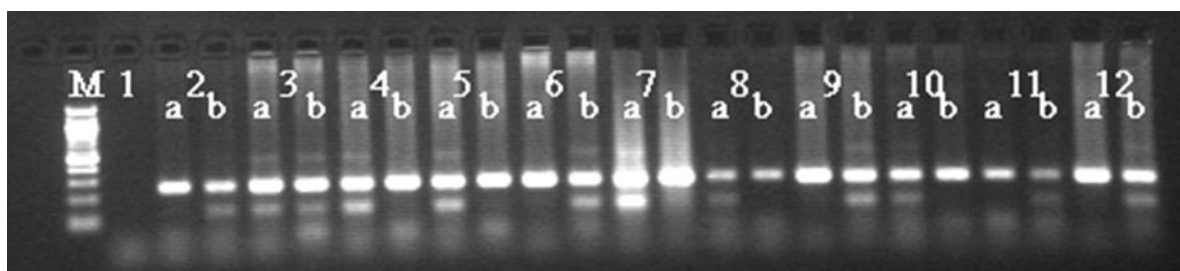


Figura 3.4: Esempio di separazione elettroforetica dei prodotti di PCR allele specifica. M: marker molecolare di dimensioni note; Lane 1: controllo negativo della PCR; lanes "a": amplificazione dell'allele selvatico; lanes "b": amplificazione dell'allele mutato. campioni 2, 6, 9, 11 e 12: omozigosi per l'allele mutato; campioni 4, 5, 7, 8 e 10: omozigosi per l'allele selvatico; campione 3: eterozigosi per il polimorfismo in esame. La banda di maggior peso molecolare, presente in tutti i campioni rappresenta il prodotto della reazione di controllo.

IL TEST DEL GUSTO

Tale test ha lo scopo di determinare la capacità di riconoscimento di una determinata qualità gustativa somministrando la stessa sostanza a diverse concentrazioni. Si basa sull'impiego di strisce di carta da filtro che sono state bagnate con quattro diverse soluzioni (NaCl, acido citrico, saccarosio e cloridrato di chinino), per distinguere i quattro gusti base: salato, acido, dolce ed amaro, a concentrazioni diverse. A queste sostanze sono state inoltre aggiunte l'olio

di colza e acqua per evocare rispettivamente i gusti grasso e acqua (Tabella). Gli stimoli sono stati applicati in maniera random ed alternata rispettivamente ai lati sinistro e destro della lingua. Ai soggetti è stato chiesto di identificare il gusto con una descrizione (salato, acido, dolce, amaro, grasso, acqua, non definito), mediante una risposta a scelta multipla. Lo studio è stato condotto in aderenza con la dichiarazione di Helsinki, come rivista nel 2001 dopo che il protocollo è stato approvato dal comitato di revisione dell'Università Politecnica delle Marche.

Stimulus	Substance	Concentration (g/mL)
Dolce	Saccarosio	- 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,4
Salato	Cloruro di sodio	- 0,016 - 0,04 - 0,1 - 0,25
Amaro	Cloridrato di chinino	- 0,0004 - 0,0009 - 0,0024 - 0,006
Acido	Acido citrico	- 0,05 - 0,09 - 0,165 - 0,3
Grasso	Olio di colza	Pura
Acqua	Acqua deionizzata	Pura

Tabella 3.1: la tabella mostra le sostanze e le rispettive concentrazioni impiegate per evocare i gusti in esame

4. RISULTATI

Abbiamo studiato un totale di 142 pazienti, dei quali 57 normopeso (41F e 16M; $20 < \text{BMI} > 25$) e 85 sovrappeso/obesi (52F e 33M; $\text{BMI} > 25$), tutti reclutati presso l'UOC di Dietetica e Nutrizione Clinica dell'Ospedale Regionale di Torrette.

In ogni soggetto siamo andati a ricercare eventuali polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) legati al recettore del gusto amaro TAS2R38 (2 polimorfismi: A49P e A262V) e al recettore del gusto dolce TAS1R3 (2 polimorfismi: C-1572T e G-1266A).

Non è stata rilevata alcuna differenza significativa nella distribuzione allelica dei quattro polimorfismi investigati tra i soggetti normopeso e sovrappeso/obesi, perciò abbiamo considerato tutti i soggetti come appartenenti ad un'unica popolazione.

Di seguito sono riportati i risultati emersi:

- POLIMORFISMI A49P E V262A DEL RECETTORE TAS2R38

Dall'analisi è emerso che gli individui con il polimorfismo A49P taster (nucleotide C/amminoacido P) del recettore TAS2R38, riconoscono più facilmente il gusto dolce (0.81 ± 0.24 vs. 0.67 ± 0.29 , $t = -2.686$, $p = 0.009$). Non sono state riscontrate altre differenze significative negli altri gusti.

Per quanto riguarda invece il polimorfismo V262A sono state identificate differenze significative per i gusti salato e dolce; i soggetti aventi il polimorfismo taster (nucleotide C/amminoacido A) hanno una capacità migliore di riconoscere entrambi i gusti (0.65 ± 0.30 vs. 0.43 ± 0.34 , $t = -3.277$, $p = 0.002$ / 0.80 ± 0.24 vs. 0.64 ± 0.29 , $t = -2.919$, $p = 0.006$) ed inoltre, sia quelli omozigoti che eterozigoti per tale polimorfismo, mostrano una sensibilità gustativa complessivamente maggiore se comparati con i soggetti omozigoti per l'allele T (0.70 ± 0.16 vs. 0.58 ± 0.17 , $t = -3.435$, $p = 0.001$).

Per entrambi i polimorfismi non sono state osservate differenze nella sensibilità gustativa complessiva e specifica tra individui omozigoti ed eterozigoti.

- POLIMORFISMI C-1572T E G-1266A DEL RECETTORE TAS1R3

Sono state riscontrate differenze significative per il gusto dolce tra i genotipi CC e CT/TT per il polimorfismo C-1572T, ovvero chiunque con il genotipo omozigote o eterozigote per l'allele T mostra una sensibilità ridotta (0.48 ± 0.16 vs. 0.83 ± 0.23 , $t = -6.906$, $p < 0.001$).

Anche per il polimorfismo G-1266A sono emerse differenze per il gusto dolce tra i genotipi G/G e GA/AA; i soggetti omozigoti per l'allele G sentono più intensamente il gusto dolce (0.84 ± 0.23 vs. 0.50 ± 0.20 , $t = -7.305$, $p < 0.001$). Nei soggetti con entrambi i polimorfismi per il gusto dolce la differenza rimane confermata (0.70 ± 0.16 vs. 0.58 ± 0.17 , $t = 9.806$, $p < 0.001$). Non sono state osservate differenze significative nella sensibilità gustativa complessiva tra i soggetti che hanno o non hanno tali polimorfismi.

A seguito di un'ulteriore analisi multivariata, in cui sono stati considerati tutti e quattro i polimorfismi studiati, è emerso che i soggetti portatori di uno dei due polimorfismi del recettore TAS1R3 mostrano una sensibilità minore per il gusto dolce (C-1572T, $F(1,123) = 7.752$, $p = 0.006$; G-1266A, $F(1,123) = 7.915$, $p = 0.006$).

Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i soggetti omozigoti ed eterozigoti per tutti e quattro i polimorfismi investigati.

		Rapporto tra risposte corrette e media(SD)					
SNP	n	Dolce	Salato	Acido	Amaro	Grasso	Acqua
TAS2R38 A49P (rs713598)							
GG	39	0.667 (0.289)	0.641 (0.297)	0.718 (0.304)	0.673 (0.282)	0.410 (0.498)	0.540 (0.505)
GC/CC	103	0.806 (0.237)	0.590 (0.335)	0.750 (0.287)	0.709 (0.305)	0.470 (0.501)	0.420 (0.496)
p		0.009	0.360	0.560	0.527	0.554	0.199
TAS2R38 V262A (rs1726866)							
TT	32	0.641 (0.291)	0.430 (0.343)	0.680 (0.331)	0.672 (0.287)	0.380 (0.492)	0.440 (0.504)
TC/CC	110	0.804 (0.238)	0.650 (0.303)	0.760 (0.277)	0.710 (0.302)	0.470 (0.502)	0.450 (0.500)
p		0.006	0.002	0.223	0.552	0.332	0.867
TAS1R3 C- 1572T (rs307355)							
CC	118	0.830 (0.235)	0.593 (0.323)	0.746 (0.283)	0.695 (0.309)	0.460 (0.500)	0.460 (0.500)
CT/TT	24	0.480 (0.163)	0.635 (0.338)	0.720 (0.332)	0.720 (0.248)	0.420 (0.504)	0.420 (0.504)
p		<0.001	0.578	0.713	0.723	0.718	0.718
TAS1R3 G- 1266A (rs35744813)							
GG	113	0.836 (0.226)	0.611 (0.324)	0.743 (0.284)	0.699 (0.305)	0.450 (0.500)	0.450 (0.500)
GA/AA	29	0.500 (0.200)	0.560 (0.332)	0.733 (0.320)	0.698 (0.279)	0.450 (0.506)	0.450 (0.506)
p		<0.001	0.468	0.872	0.989	0.977	0.977

Tabella 4.1: le medie delle sensibilità gustative in relazione ai polimorfismi studiati.

7 .DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'obesità è oggi la seconda causa di morte prevenibile in tutto il mondo, dovuta principalmente ad un eccessivo introito calorico rispetto al dispendio energetico.

La sensibilità gustativa gioca un ruolo primario nel guidare le scelte alimentari. Un numero sempre più maggiore di articoli scientifici sta dimostrando che esiste una correlazione tra preferenze gustative e variazioni genetiche (Keller KL et al. 2016; Chamoun E et al. 2018). Il nostro studio ha cercato di dimostrare la relazione tra percezione gustativa e polimorfismi dei recettori del gusto: 57 volontari sani ed 85 pazienti sovrappeso/obesi sono stati genotipizzati per i polimorfismi rs713598 e rs1726866 del gene TAS2R38 e rs307355 e rs35744813 nella regione del promotore del gene TAS1R3.

Parecchi studi hanno concentrato la loro attenzione sull'influenza che i genotipi AVI/PAV hanno sulla sensibilità dello stimolo del dolce, ma i risultati sono spesso contraddittori. Duffy et.al, in uno studio del 2006, ha riportato che i soggetti supertaster dell'amaro (PROP) mostrano una maggiore reattività ad una ampia gamma di gusti, incluso il dolce (Duffy VB et al. 2006), mentre, in uno precedente, donne supertaster, hanno un minore gradimento per cibi dolci e grassi (Duffy and Bartoshuk, 2000). Secondo Mennella et al. (Mannella JA et al. 2005) la correlazione tra preferenza verso cibi dolci e genotipo del gene TAS2R38 è valida nei bambini, ma non negli adulti, teoria che non è stata confermata da O'Brien et al (O'Brien SA et al. 2013). Il nostro studio ha dimostrato che anche un singolo polimorfismo del genotipo PAV/AVI determina, nei soggetti analizzati, un'aumentata reattività al gusto dolce: per la prima volta si è arrivati alla conclusione che la condizione di eterozigosi per il polimorfismo A49P o V262A è sufficiente per determinare un aumento nella percezione del gusto dolce.

Negli anni, anche le variazioni genetiche dei recettori del gusto dolce, TIR1R2 e TIR1R3, sono state descritte e correlate ai cambiamenti della sensibilità per lo zucchero. Per esempio, Fushan AA et al. (Fushan et al. 2009) e Haznedaroglu et al. (Haznedaroglu E et al. 2015) hanno dimostrato che le differenze individuali nella preferenza del gusto dolce sono legate ai polimorfismi C-1572T e G-1266A del gene TAS1R3. I nostri risultati sono in accordo con quanto sopra menzionato; in particolare, l'allele T, anche in condizioni di eterozigosi, provoca una riduzione dell'attività del promotore in confronto all'allele C e quindi una ridotta traduzione della proteina recettoriale. Dall'analisi possiamo confermare che l'alterazione della percezione del gusto dolce non è correlata al BMI. Anderson et al. e Joseph et al. (Anderson

GH et al. 1995; Joseph RT et al. 2016) confermano che non esiste un legame tra BMI e la percezione del gusto dolce, ma al contrario, in studi come quello di Hwang et al (Hwang LD et al. 2016), che rappresentano la maggior parte dei dati presenti in materia, questo legame è evidenziabile. Quest'ultima evidenza sottolinea quanto ancora siamo lontani dall'identificare con precisione le cause di una patologia complessa come l'obesità e di quanto ancora poco sappiamo a riguardo di scelte alimentari in relazione a fattori genetici, come i recettori gustativi della lingua.

Ad ogni modo, studiare tali polimorfismi è dunque di fondamentale importanza per sviluppare una nutrizione personalizzata in base alla costituzione genetica dell'individuo. In questo modo si potranno formulare diete, che tenendo conto dell'unicità dei soggetti, diversi per età, sesso e razza, potranno essere impiegate non più solo come strumento terapeutico, ma anche preventivo, in quanto identificare i soggetti, ed in modo particolare i bambini, in cui questi SNPs sono presenti consentirebbe un follow-up nutrizionale più stretto evitando l'insorgenza dell'obesità.

8.BIBLIOGRAFIA

- Abrumad NA.** CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Clin Invest.* 2005;115(11):2965-7;
- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS.** A novel family of mammalian taste receptors. *Cell.* 2000;100(6):693-702;
- Anderson GH.** Sugars, Sweetness and food intake. *Am J Clin Nutr.* 1995;62(1):195-201;
- Arthur M. Lesk,** Introduzione alla genomica, 2007;
- Behrenz M, Brockhoff A, Kuhn C, Bufe B, Winking M, Meyerhof W.** The human taste receptors hTAS2R14 response to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(2):479-85;
- Chamoun E, Mutch DM, Allen-Vercoco E et al.** A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviors and health. *Crit Rev Sci Nutr.* 2018;58(2):194-207;
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA et al.** T2Rs function as bitter taste receptors *Cell.* 2000;100(6):703-11;
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K et al.** Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science.* 2003;301(5634):850-53;
- Demori,** Stress e cibo un legame indissolubile. *Sipnei news n°3.* 2015;
- Dinehart ME, Hayes JE, Bartoshuk LM, Lanier SL, Duffy VB.** Bitter taste markers explain variability in vegetable sweetness, bitterness, and intake. *Physiology & Behavior.* 2006;87(2):304-13
- Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K et al.** Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol Behav.* 1985;35(4):617-22;
- Duffy VB, Bartoshuk LM.** Food acceptance and genetic variation in taste. *J Am Diet Assoc.* 2000;100(6):647-55;-**Duffy VB, Hayes J.E, Dinehart ME.** Genetic differences in sweet taste perception. *Optimising the sweet taste in foods.* 2006; 30–53;
- Eny KM, Wolever TM, Corey PM, El-Sohemy A.** Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(6):1501-10;
- Fuller JL.** Single-locus control of saccharin preference in mice. *J. Hered.* 1974;65(1):33-6;

- Fusan AA, Simons CT, Slack JP, Manichaikul A, Drayna D.** Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Curr Biol.* 2009;19(15):1288-93;
- Haznedaroglu E, Koldemir-Gunduz M, Bakir-Coskun N et al.** Association of sweet taste receptor gene polymorphism with dental caries experience in school children. *Caries Res.* 2015;49(3):275-81;
- Herbert A, Gerry NP, McQueen MB et al.** A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science.* 2006;312(5771):279-83;
- Hwang LD, Cuellar-Partida G, Ong JS et al.** Sweet taste perception is associated with body mass index at the phenotypic and genotypic level. *Twins Res Hum Genet.* 2016;19(5):465-71;
- Inoue H, Yamakawa-Kobayashi K, Suzuky Y, Nakano T, Hayashi H, Kuwano T.** A case of study on the association of variation of bitter-taste receptor gene TAS2R38 with the height, weight and energy intake in Japanese female college students. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2013;59(1):16-21;
- Joseph PV, Reed DR, Mennella JA.** Individual differences among children in sucrose detection threshold: relationship with age, gender and bitter taste genotype. *Nutr Res.* 2016;65(1):3-12;
- Kant R,** Sweet proteins: potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutrition Journal.* 2005;9:4-5;
- Keller KL, Adise S.** Variation in the ability to taste bitter thiourea compounds: implications for food acceptance dietary intake and obesity risk in children. *Annu Rev Nutr.* 2016;36:157-82;
- Kitagawa M, Kusakabe Y, Miura H, Ninomiya Y, Hino A.** Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(1):236-42;
- Kobayashi J, Nidhida T, Ameis D et al.** A heterozygous mutation (the codon for Ser447---a stop codon) in lipoprotein lipase contributes to a defect in lipid interface recognition in a case with type I hyperlipidemia *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;182(1):70-7;
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y et al.** Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor *Nature.* 2000;407(6807):971-77;

- Liew CS, Gupta ED.** Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):1-10;
- Li X, Li W, Wang H et al.** Pseudogenization of sweet-receptor gene accounts for cats' indifference towards sugar. *PLoS Genet.* 2005;1(1):27-35;
- Lush IE.** The genetic of tasting in mice.VI. saccharin, acesulfame, dulcin and sucrose. *Genet Res.* 1989;53(2):95-99;
- Maj Gen, Suhaib Ahmed.** Amplifications Refractory Mutation System (ARMS). 2014;
- Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB.** A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature.* 2000;404(6778): 601-4;
- Melo SV, Agnes G, Vitolo MR, Mattevi VS, Campagnolo PDB, Almeida S.** Evaluation of the association between the TAS1R2 and TAS1R3 variants and food intake and nutritional status in children. *Genet Mol Biol.* 2017;40(2):415-420;
- Mennella JA, Pepino MY, Reed DR.** Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics.* 2005;115(2):216-22;
- Millington GW.** The role of proopiomelanocortin (POMC) neuron in feeding behavior. *Nutrition & Metabolism.* 2007;4;
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandreshekar J, Zuker CS, Ryba NJ.** The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature.* 2005;434(7030):225-229;
- Nelson G, Chandrashekar J, hoon MA et al.** An amino-acid taste receptor. *Nature.* 2002;416(6877):199-202;
- Newman DL, Hoffjan S, Bourgain C et al.** Are common disease susceptibility alleles the same in outbred and founder population? *Eur J Hum Genet.* 2004;12(7):584-90;
- O'Brien SA, Feeney EL, Scannel AG, Markey A; Gibney ER.** Bitter taste perception and dietary intake patterns in irish children. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2013;6(1):43-58;
- Ooi SX, Lee PL, Law HY, Say YH.** Bitter receptor gene (TAS2R38) P49A genotypes and their associations with aversion to vegetables and sweet/fat foods in Malaysian subjects. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010;19(4):491-8;
- Ramos-Lopez O, Panduro A, Martinez-Lopez E, Roman S.** Sweet Taste Receptor TAS1R2 polymorphism (Val/Val) is associated with a higher carbohydrate intake and hypertriglyceridemia among the population of West Mexico. *Nutrients.* 2016;8(2):101;
- Saladin SK.** Sensory organs In: Human anatomy. 3rd ed. Piccin; 2011;466-68;

- Sirangelo TM.** Il ruolo della leptina e dei suoi recettori nell'obesità. La rivista di Scienza dell'alimentazione. 2016;
- Smemo S, Tena JJ, Kim KH et al.** Obesity-associated variants within FTO from long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 2014;507(7492):371-5;
- Stumvoll M, Haring H.** The peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*. 2002;51(8):2341-47;
- Tepper BJ, Koelliker Y, Liqiang Zhao L et al.** Variation in the bitter-taste receptor gene TAS2R38, and adiposity in a genetically isolated population in southern Italy. *Obesity*. 2008;16(10):2289-95;
- Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G, Humphries S.** Association between genetic variation at the APO AI- CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. *Clin Genet*. 1994;46(6):385-97;
- Yao YS, Li J, Jin YL, Chen Y, He LP.** Association between PPAR-G2 Pro12Ala polymorphism and obesity: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2015;42(6):1029-38;
- Zocchi D, Wennemuth G, Oka Y.** The cellular mechanism for water detection in the mammalian taste system. *Nat Neurosci* 2017;20(7):927– 933.