

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina



**SÍNDROME DE PRADER-WILLI COMO MODELO DE
OBESIDAD: GHRELINA, PÉPTIDO YY, ADIPONECTINA Y
PARÁMETROS INFLAMATORIOS**

Memoria presentada por

Olga Giménez Palop

para la obtención del título de Doctor en Medicina

Trabajo realizado bajo la dirección de la **Dra. Assumpta Caixàs Pedragós**

y codirigida por el **Dr. Dídac Mauricio Puente**

ÍNDICE

1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS.....	5
2. AGRADECIMIENTOS.....	6
3. JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA UNITARIO.....	8
3.1. SÍNDROME DE PRADER-WILLI.....	8
3.1.1. GENÉTICA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	8
3.1.2. ASPECTOS ENDOCRINO-METABÓLICOS.....	9
3.1.2.1. Composición corporal y distribución de la grasa.....	9
3.1.2.2. Hormona de crecimiento.....	10
3.1.2.3. Metabolismo de la glucosa y sensibilidad a la insulina..	13
3.1.2.4. Hipogonadismo.....	14
3.1.2.5. Hiperfagia.....	15
3.2. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	16
3.2.1. SEÑALES DE CONTROL DEL APETITO.....	17
3.2.1.1. Mecanismos centrales	18
3.2.1.2. Señales periféricas de adiposidad	21
3.2.1.3. Señales periféricas de saciedad.....	22
3.2.1.4. La ghrelina como señal de hambre.....	28
3.3. NEUROPEPTIDOS HIPOTALÁMICOS Y REGULACIÓN DEL APETITO EN EL SÍNDROME DE PRADER-WILLI: POSIBLES ALTERACIONES.....	33
3.3.1. ALTERACIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	33
3.3.2. ALTERACIONES A NIVEL PERIFÉRICO.....	34

3.4. EL ADIPOCITO Y LA ADIPONECTINA: UN DIÁLOGO ENTRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA, LA INFLAMACIÓN Y LA ARTERIOSCLEROSIS.....	36
3.4.1. ADIPONECTINA.....	37
3.4.2. INFLAMACIÓN.....	39
3.4.3. ADIPONECTINA E INFLAMACIÓN EN EL SÍNDROME DE PRADER-WILLII.....	42
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	44
5. OBJETIVOS CONCRETOS.....	45
6. RESULTADOS	46
6.1. ESTUDIO 1: La menor supresión de los niveles postprandiales de ghrelina en el Síndrome de Prader-Willi se asocia a unos niveles de péptido YY en ayunas disminuidos y a una respuesta postprandial truncada.....	46
6.2. ESTUDIO 2: Los niveles postprandiales de adiponectina no parece que contribuyan a la patogénesis de la obesidad en el Síndrome de Prader-Willi.....	54
6.3. ESTUDIO 3: Los sujetos adultos con Síndrome de Prader-Willi muestran una mayor inflamación de bajo grado que los sujetos obesos de iguales características antropométricas.....	60
7. DISCUSIÓN CONJUNTA DEL TEMA.....	66
8. CONCLUSIONES FINALES.....	77
9. BIBLIOGRAFÍA.....	78
10. ARTÍCULOS ORIGINALES DE LA TESIS DOCTORAL.....	112
10.1. ARTÍCULO 1: “La menor supresión de los niveles postprandiales de ghrelina en el Síndrome de Prader-Willi se asocia a unos niveles de péptido YY en ayunas disminuidos y a una respuesta postprandial truncada”.....	112

10.2. ARTÍCULO 2:	”Los niveles de adiponectina postprandiales no parece que contribuyan a la patogénesis de la obesidad en el Síndrome de Prader-Willi”.....	113
10.3. ARTÍCULO 3:	“Los sujetos adultos con Síndrome de Prader-Willi muestran una mayor inflamación de bajo grado que los sujetos obesos de iguales características antropométricas”.....	114
11. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME DE PRADER-WILLI.....		115
12. ANEXO:		
	“Los niveles de ghrelina circulantes en la disfunción tiroidea estan relacionados con la resistencia a la insulina, y no con el hambre, la ingesta o los parámetros antropométricos”	118

1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Esta Tesis se presenta en forma de compendio de publicaciones según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Barcelona.

Se centra en el estudio del Síndrome de Prader-Willi como un modelo de obesidad. En concreto, en el estudio de varias de las hormonas que regulan el metabolismo energético (ghrelina, péptido YY y adiponectina) y de algunas de las citocinas que forman parte del sistema inmune innato. Los resultados obtenidos en los pacientes con Síndrome de Prader-Willi se comparan con los obtenidos en sujetos obesos y sanos con normopeso.

Su núcleo principal son tres artículos que han sido aceptados para su publicación en tres revistas internacionales.

Además la doctoranda ha formado parte activa del equipo de investigación de otro artículo centrado en el estudio de la ghrelina en la disfunción tiroidea. Este artículo se recoge en el Anexo.

2. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Assumpta Caixàs Pedragós, directora de la tesis, por haber confiado en mi para llevar a cabo este proyecto y por su ayuda y dedicación incondicionales.

Al Dr. Dídac Mauricio Puente, codirector de la tesis, porque sin él, este proyecto no hubiera existido.

Al Dr. Carles Villabona, tutor, por sus enseñanzas y por haberme transmitido su interés por la investigación.

A las diplomadas en enfermería, Sra Imma Gallach y Sra Blanca Macho por su ayuda técnica en la realización de las extracciones y procesado de las muestras de sangre.

A la *Associació Catalana de Síndrome de Prader-Willi* por su ayuda a contactar con los pacientes.

A todos los participantes y a sus familiares por su amable colaboración.

Al Dr. José Miguel González Clemente por sus ideas y su colaboración con el análisis de los resultados.

A la Dra. Neus Potau y su equipo del Hospital de la Vall d'Hebron, al Dr. Joan Vendrell y su equipo del Hospital Joan XXIII y al Dr. Eugenio Berlanga de la UDIAT por su ayuda en las determinaciones de laboratorio.

Al Dr. Gabriel Giménez Pérez por compartir su amplia experiencia en el tratamiento y seguimiento clínico de los pacientes con Síndrome de Prader-Willi.

Al Dr. Ramón Nosàs, a la Dra. Roser Trallero, a la Dra. Carme Vilardell y al Dr. Jaume Arroyo por su ayuda en el reclutamiento de pacientes con Síndrome de Prader-Willi, participantes obesos y participantes sanos con normopeso.

A Anna Espinal del *Servei d'Estadística de la UAB*, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A Marcos Catalán por su ayuda en la búsqueda bibliográfica.

A todo el equipo de la *Unitat de Diabetis Endocrinologia i Nutrició* (UDEN) de Sabadell por prestarme su ayuda en todo momento.

A mi familia y amigos, pero especialmente a mis padres por su ilusión y continuo apoyo.

Parte de este estudio ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS): Red de Grupos de Diabetes Mellitus (RGDM 03/212), Instituto Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo y por la Beca CIR 2002/23 de la Fundació Parc Taulí.

3. JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA UNITARIO

La obesidad es una patología de prevalencia creciente en las sociedades modernas . Desde hace varios años se sabe que no sólo depende de factores relacionados con el entorno sino que también está en gran parte condicionada por factores genéticos.

En los últimos años se está investigando acerca de cuáles son los mecanismos que regulan el peso corporal tanto en personas sanas como en diferentes patologías que se caracterizan, entre otras cosas, por asociar obesidad. Este es el caso del síndrome de Prader-Willi del que se ocupa el presente trabajo.

3.1. SÍNDROME DE PRADER-WILLI

3.1.1. GENÉTICA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El Síndrome de Prader-Willi (SPW) es la causa más frecuente de obesidad genética. Fue descrito por primera vez en 1956. La incidencia es de aproximadamente un caso por cada 10.000 a 25.000 nacidos vivos. Está provocado por una falta de expresión de los genes de la región cromosómica 15q11q13, que generalmente se expresan en el cromosoma paterno. Esta falta de expresión se debe en un 75% de los casos a una delección de la región 15q11q13 en el cromosoma paterno. En otro 22% a una disomía uniparental materna, de forma que estos genes no se expresan al provenir la información exclusivamente de la madre, en un 3% por mutación de la impronta por lo que tampoco se expresan y en <1 % por una reorganización cromosómica en la que se produce una translocación a este nivel. La función de los genes que no se expresan en el SPW no se conoce con exactitud. Se trata de un síndrome difícil de diagnosticar porque muchas de sus características son sutiles o no específicas y otras cambian con la edad. El diagnóstico se basa en una serie de Criterios Mayores y Criterios Menores (ver pág.115). Los Criterios Mayores incluyen: hipotonía neonatal e infantil con dificultad para succionar que mejora con la edad;

problemas para la alimentación en la infancia y escasa ganancia de peso con necesidad de técnicas especiales de alimentación, rápido aumento del peso entre los 1-6 años que da lugar a obesidad; facies característica que incluye una frente estrecha, ojos almendrados y labio superior fino; hipogonadismo; retraso mental con dificultad para el aprendizaje; hiperfagia, y alteración en la región cromosómica 15q11q13. La obesidad mórbida y sus complicaciones son la mayor causa de morbimortalidad en estos pacientes. El tratamiento ha de ser precoz y multidisciplinar, enfocado a frenar la ganancia de peso, con una dieta hipocalórica, ejercicio regular y supervisión del acceso a la comida. Por otra parte, se deben suplir los déficits hormonales como el de la hormona de crecimiento (GH) y las hormonas sexuales (1-4).

3.1.2. ASPECTOS ENDOCRINO-METABÓLICOS

3.1.2.1. Composición corporal y distribución de la grasa:

Los pacientes con SPW tienen un mayor porcentaje de masa grasa y un menor porcentaje de masa magra comparado con individuos de peso normal, y también respecto a individuos con obesidad simple. Esta masa magra está ya disminuida en los primeros años de vida y continua disminuyendo con la edad. Dado que la masa magra es reflejo de la masa muscular, es posible que su disminución contribuya a la hipotonía que les caracteriza (5-7). La gran ingesta calórica, el hipogonadismo, el déficit de GH y una actividad física reducida pueden ser los causantes de este acúmulo de grasa (8, 9). El músculo es un tejido metabólicamente muy activo, de forma que una menor masa de este tejido unido a una actividad física reducida explican el bajo gasto energético basal que presentan estos pacientes, que puede llegar hasta el 50% menos que un obeso sano (10-15).

Por otra parte, se ha observado que a igual cantidad de grasa subcutánea presentan una menor cantidad de grasa visceral comparado con individuos obesos sanos (menor razón

grasa visceral/grasa subcutánea). Esta menor grasa visceral se asocia con menos resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia, y una mayor extracción hepática de glucosa (16). Por este motivo tienen un menor riesgo relativo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y complicaciones cardiovasculares que un individuo obeso sano, aunque mayor que el que tiene un individuo con normopeso.

Además, tienen una menor densidad mineral ósea que los individuos obesos sanos o individuos normales (5). Todas estas diferencias se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1:

	Obesidad no-SPW	SPW
Masa magra	aumentada	disminuida
Masa muscular	aumentada	disminuida
Masa ósea	aumentada	disminuida
Masa grasa	aumentada	aumentada
Grasa visceral	aumentada	disminuida
Grasa troncal	aumentada	aumentada
Razón masa magra/grasa	disminuida	disminuida

3.1.2.2. Hormona de crecimiento

Los pacientes con SPW tienen un peso y una talla al nacer dentro de la normalidad. Sin embargo, se caracterizan por presentar talla baja (media de 155 cm en hombres y de 148 cm en mujeres) debido a un déficit secretor de GH que se empieza a manifestar como un retraso de crecimiento a partir de los 15 años, asociado con una ausencia de estirón puberal (17).

Hay muchos datos que indican que tienen una secreción de GH reducida: un pico de GH en las pruebas de estimulación por debajo de lo normal, una secreción de GH espontánea disminuida y niveles bajos de IGF-1. Dependiendo de la prueba de estimulación que se utilice, entre un 40-100% de los pacientes con SPW cumplen con los criterios que definen un déficit de GH (pico de GH inferior a 10 μ g/l en respuesta a una o dos pruebas de estimulación). La mayoría de los niños afectados también muestra una disminución de la secreción de GH cuando se determinan niveles seriados en un perfil de 24 h, y niveles bajos de IGFBP-3. Sin embargo, los niños con obesidad no-SPW también presentan una secreción alterada de GH pero con niveles elevados de IGF-1, sugiriendo una retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisario (18), y además no tienen alteración de los niveles de IGFBP-3 (19).

El déficit de GH en los pacientes con SPW no sólo se explica por su obesidad sino también por a una disfunción a nivel hipotalámico. Estudios autópsicos han demostrado la existencia de un núcleo paraventricular de menor tamaño, una reducción del 42-54% en el número de neuronas secretoras de oxitocina y un 30% menos de neuronas que producen hormona liberadora de GH (GHRH) en el núcleo arcuato, una regulación negativa del neuropéptido Y (NPY) y una deficiencia de vasopresina (20, 21). Tanto el NPY como la oxitocina son hormonas involucradas en la regulación del apetito. Estudios con resonancia magnética han revelado un punto brillante anormal en el lóbulo posterior de la hipófisis en algunos individuos afectos, que se considera como un signo de disfunción hipotalámica (22), siendo frecuente además el hallazgo de una hipoplasia hipofisaria (23).

Las alteraciones en el metabolismo lipídico e hidrocarbonado presentes en estos pacientes son parcialmente explicables por el déficit de GH (Tabla 2). El tejido adiposo es un órgano diana para la acción de la GH. La falta de GH da lugar a un aumento de la masa de tejido

graso debido a un aumento de volumen de los adipocitos, especialmente de las zonas centrales del cuerpo (24, 25).

Tabla 2:

	Obesidad no-SPW	SPW
Niños		
Insulina en ayunas	aumentada	disminuida
Glucosa en ayunas	aumentada	normal
Adultos		
Insulina en ayunas	aumentada	aumentada (en obesidad)
Glucosa en ayunas	aumentada	aumentada (en obesidad)
Triglicéridos	aumentados	aumentados
Colesterol LDL	aumentado	aumentado
Colesterol HDL	disminuido	disminuido

El tratamiento con GH en niños con SPW está ampliamente experimentado. La duración del tratamiento oscila entre los 6 y 36 meses, aunque algunos la reciben durante más tiempo. Con el tratamiento con GH los niños ganan altura, aumentan su velocidad de crecimiento especialmente a partir del segundo año de tratamiento, y pueden llegar a alcanzar su talla diana (26). Además de los efectos sobre la talla, la GH influye en la composición corporal reduciendo la masa grasa y aumentando la masa muscular (27). Por otra parte mejora la agilidad, la apariencia física, la energía y la resistencia al ejercicio (28). Dos estudios recientes sugieren además, que el tratamiento con GH puede mejorar la función respiratoria en niños con SPW. Por un lado mejora la fuerza muscular, y por otro mejora la ventilación y la sensibilidad de los quimiorreceptores periféricos al dióxido de carbono, sugiriendo que la GH ejerce un efecto directo o indirecto en el sistema de

regulación central respiratorio (29-31). Sin embargo, en otro estudio reciente en el que se revisan los efectos adversos del tratamiento con GH en 328 niños con SPW se aconseja administrar este tratamiento con precaución si existe obesidad extrema o bien alteraciones respiratorias, tras haberse observado en esta serie 5 casos de muerte súbita. El efecto adverso más frecuentemente observado fue la escoliosis, seguida de la hiperglicemia (32). En el adulto, el tratamiento con GH también produce un cambio en la composición corporal similar al de los niños, con una disminución de la masa grasa y un aumento de la masa magra, al igual que ocurre en pacientes adultos con un déficit severo de GH. Mejora la capacidad física probablemente debido al aumento de la masa magra, y no se han observado cambios en la densidad mineral ósea tras 12 meses de tratamiento con GH (33). A pesar de que la GH tiene efectos diabetogénicos, no afecta de forma negativa al metabolismo de la glucosa o de los lípidos (33) a diferencia de lo observado en niños después de 12 a 24 meses de tratamiento con GH (32).

3.1.2.3. Metabolismo de la glucosa y sensibilidad a la insulina

La obesidad es uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar una diabetes mellitus tipo 2. Junto con la predisposición genética, la obesidad influye en la edad de aparición y en la magnitud de la hiperglicemia. La obesidad favorece la resistencia a la insulina y ésta junto con la hiperinsulinemia acompañante, caracteriza la fase previa a la aparición de la diabetes.

Los pacientes con SPW tienen una prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 más alta que la población general (34). Sin embargo, cuando se compara este grupo de pacientes con individuos obesos, para un mismo grado de obesidad, la respuesta de la insulina a una comida mixta tanto en adultos como en niños (35, 36), y a una sobregarga oral de glucosa en niños, es significativamente menor en pacientes con SPW para una respuesta de glucosa similar. Esto indica que tienen una menor resistencia a la insulina y que, por tanto,

son menos susceptibles a la aparición de diabetes mellitus tipo 2. Estudios en adultos con sobrecarga de glucosa intravenosa demuestran que: tanto la primera como la segunda fase de la secreción de insulina es significativamente más baja que en obesos sanos a pesar de niveles de glucosa similares; la respuesta del C-péptido es también menor; la extracción hepática de insulina y el aclaramiento de insulina están aumentados en comparación con individuos obesos controles, y existe una disociación entre obesidad y resistencia a la insulina, en contraste con individuos obesos normales. En conclusión los mecanismos glucorreguladores en los pacientes obesos con SPW son diferentes de aquellos obesos no-SPW (37).

3.1.2.4. Hipogonadismo

El exceso de peso produce varias alteraciones en el sistema reproductor. La relación entre la obesidad y la disfunción gonadal es multifactorial, y en ella pueden estar implicados tanto factores centrales como periféricos. Sin embargo, la disfunción gonadal asociada con el SPW parece mediada por mecanismos diferentes a los asociados a la obesidad.

Los hombres con SPW acostumbran a tener genitales externos hipoplásicos, incluyendo micropene en varones, y labios menores hipoplásicos en mujeres (38). La adrenarquia puede ocurrir de forma temprana, pero la maduración gonadal acostumbra a estar retrasada o bien ser incompleta, con retraso en la menarquia, amenorrea primaria u oligomenorrea (8, 39, 40). Los hombres adultos suelen tener niveles de testosterona bajos, aunque los niveles de 17β -estradiol en las mujeres pueden estar en el rango de la fase folicular temprana, posiblemente por el aumento de la aromatización por el exceso de tejido adiposo. El grado de hipogonadismo es variable, y es más severo en hombres que en mujeres.

La causa exacta de la alteración del eje hipotálamo-gonadal es desconocida. Tiene componentes de hipogonadismo hipogonadotrofo debido a defectos hipotalámicos. En

mujeres asocia componentes de síndrome de ovario poliquístico relacionado con la obesidad, pero también de fallo gonadal primario. Éste último, en varones está relacionado con la frecuente aparición de criptorquidia, que a su vez está favorecida por el hipogonadismo hipogonadotropo (38, 39).

Idealmente este hipogonadismo debería ser sustituido para evitar la pérdida de masa ósea. Sin embargo, en algunos casos no es posible una reposición completa por la asociación con un exceso de agresividad en varones con el tratamiento con testosterona.

3.1.2.5. Hiperfagia

El SPW es una patología neurogenética compleja. En los primeros meses de vida estos sujetos tienen dificultades para la alimentación por problemas para la succión debido a la hipotonía. Sin embargo, a partir de los 2 años de edad desarrollan una hiperfagia que les conduce a la obesidad mórbida.

El comportamiento alimentario de los pacientes con SPW se diferencia del de un individuo obeso o delgado en la duración de la ingesta. Así cuando se les ofrece bocadillos a estos 3 grupos durante 1 hora, *ad libitum*, los pacientes con SPW comen sin parar durante la hora entera, mientras que los sujetos sanos y obesos generalmente han acabado de comer a los 15 minutos (41-43). Todavía no está claro si esto es debido a un aumento del apetito o una disminución de la saciedad.

También se han estudiado las preferencias por los tipos de alimentos. En un estudio, los pacientes con SPW no mostraron diferencias en las preferencias respecto a los controles (44). Sin embargo, en otro estudio se observó que tenían una preferencia por alimentos ricos en hidratos de carbono sobre aquellos ricos en proteínas, y de los ricos en proteínas respecto a los ricos en grasas, mientras que los individuos de peso normal u obesos no mostraron diferencias en sus preferencias (45).

3.2. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Este término refleja el proceso de regulación activa mediante el cual se consigue mantener un peso estable durante largos periodos de tiempo a pesar de que la ingesta calórica varíe de forma sustancial día a día, debido a multitud de factores como por ejemplo factores emocionales y sociales. Cada vez más, se van conociendo nuevas moléculas que están involucradas en la señalización relacionada con la ingesta calórica, la cantidad de grasa acumulada en el cuerpo, y otros mecanismos que intervienen en la regulación del peso (Figura 1).

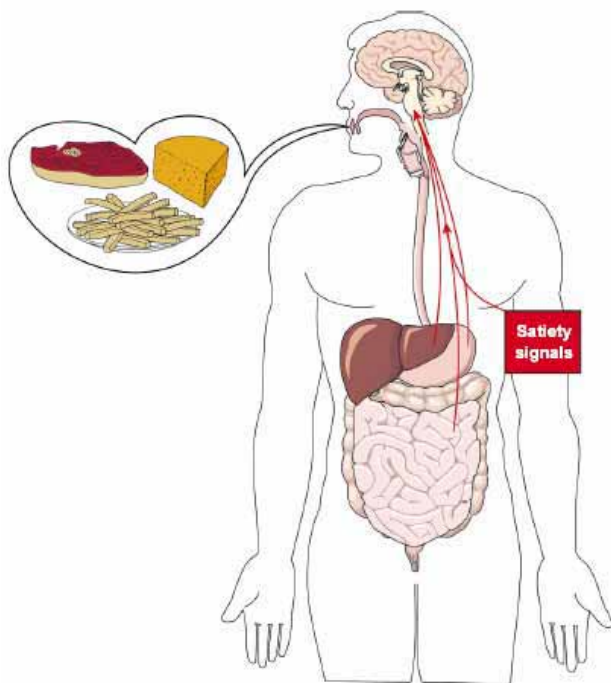


Figura 1: El rol de las señales de saciedad en el control de la ingesta. Una vez la ingesta se ha iniciado, los alimentos interactúan con receptores en la lengua, la orofaringe, el estómago, y el duodeno, así como en el hígado y otros órganos. La detección, procesamiento, y absorción de los alimentos genera señales de saciedad que provocan una retroalimentación negativa en el sistema nervioso central, y estas señales dan lugar al fin de la ingesta. Estas señales llegan al cerebro a través de fibras nerviosas viscerales aferentes y a través de la sangre. *Woods S et al. Science 1998; 280: 1378-1383*

3.2.1. SEÑALES DE CONTROL DEL APETITO

El control de la ingesta y del peso corporal es un proceso muy complejo en el que intervienen señales que aportan información de varios lugares del organismo y de muchas áreas del cerebro. Esta es una área en la que se está investigando intensamente por las posibles aplicaciones que representa en el tratamiento de la obesidad.

La cantidad de grasa corporal, a menudo estimada como el peso corporal, es estable durante largos períodos en los adultos. Aunque está determinada genéticamente, tiene una variación bastante amplia. En un entorno estable el peso se mantendrá entre estos límites predeterminados. En aquellos casos en los que por factores ambientales el peso sobrepase estos límites, una vez reestablecidas las condiciones previas, tenderá de nuevo a volver a ellos (46-52).

Formando parte del gran sistema del control ponderal se encuentran por un lado, un conjunto de señales que informan al centro de control del apetito sobre cuál es la adiposidad del organismo (leptina, insulina) y que a su vez, influyen sobre otras señales que controlan la saciedad. Si un individuo ha perdido peso, le llega una menor cantidad de señales de adiposidad, y ésto provoca que haya menos sensibilidad a las señales de saciedad, de forma que este individuo tenderá a una ingesta más cuantiosa. Al contrario, si un individuo ha ganado peso, se vuelve más sensible a las señales de saciedad. Este mecanismo permite mantener un peso estable durante largos períodos de tiempo (50, 53-55). Otra parte del sistema lo forman las señales procedentes del sistema gastrointestinal, de las cuales unas inducen a la ingesta (orexígenas) y otras provocan saciedad (anorexígenas) (Figura 2).

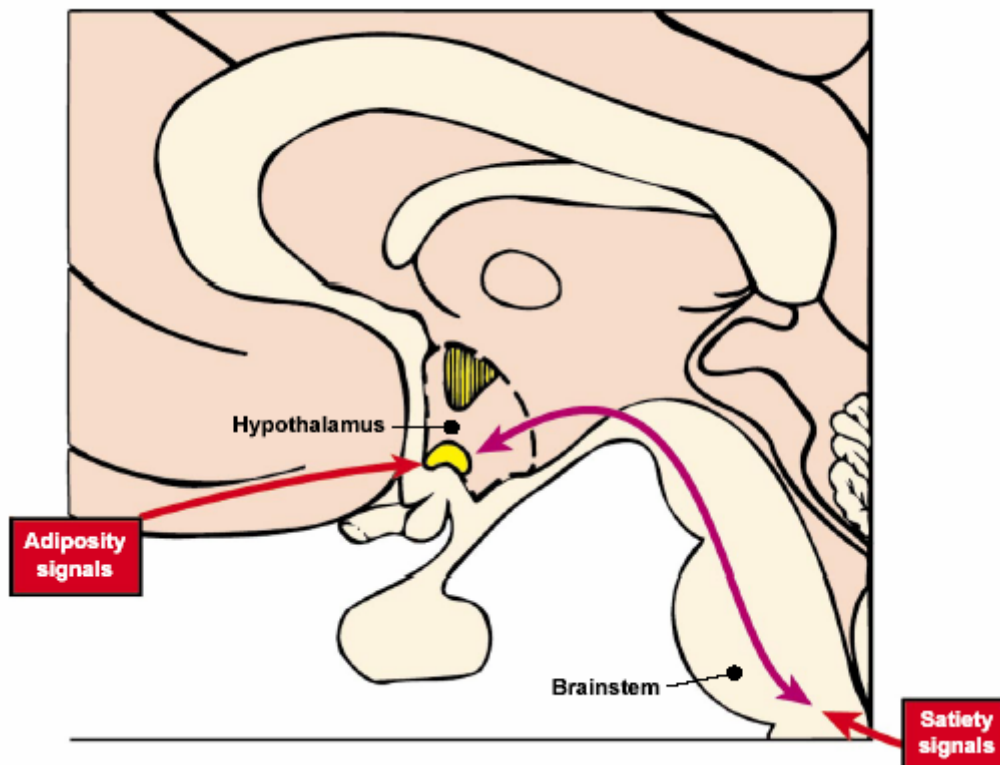


Figura 2: Integración de señales reguladoras de la ingesta desde el tejido adiposo, el intestino, y el cerebro. Las señales circulantes de adiposidad, leptina e insulina, penetran a través de la barrera hematoencefálica y estimulan receptores en neuronas del hipotálamo. Las señales de saciedad generadas por la ingesta de alimentos entran en la región caudal del tronco cerebral (como hormonas que actúan localmente en neuronas dentro del tronco cerebral en sí mismo o a través de señales viscerales aferentes generadas en la boca o el intestino), donde tienen influencia sobre reflejos relacionados con la aceptación o no de la comida. La información acerca de la saciedad, también llega al hipotálamo, donde se integran la información cognitiva y las señales de adiposidad. Un aumento de la actividad de las señales de adiposidad aumenta la capacidad de las señales de saciedad para terminar la ingesta. La información integrada es entonces dirigida de vuelta al tronco cerebral y de ahí a áreas que controlan la ingesta y el gasto energético. *Woods S et al. Science 1998; 280: 1378-1383*

3.2.1.1. Mecanismos centrales

El hipotálamo es el principal centro regulador del apetito, principalmente a nivel del núcleo arcuato (AN), pero también están implicados el núcleo paraventricular (PVN), y el área hipotálmica lateral (LHA). El núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco cerebral es el otro gran centro regulador del apetito (Figura 3).

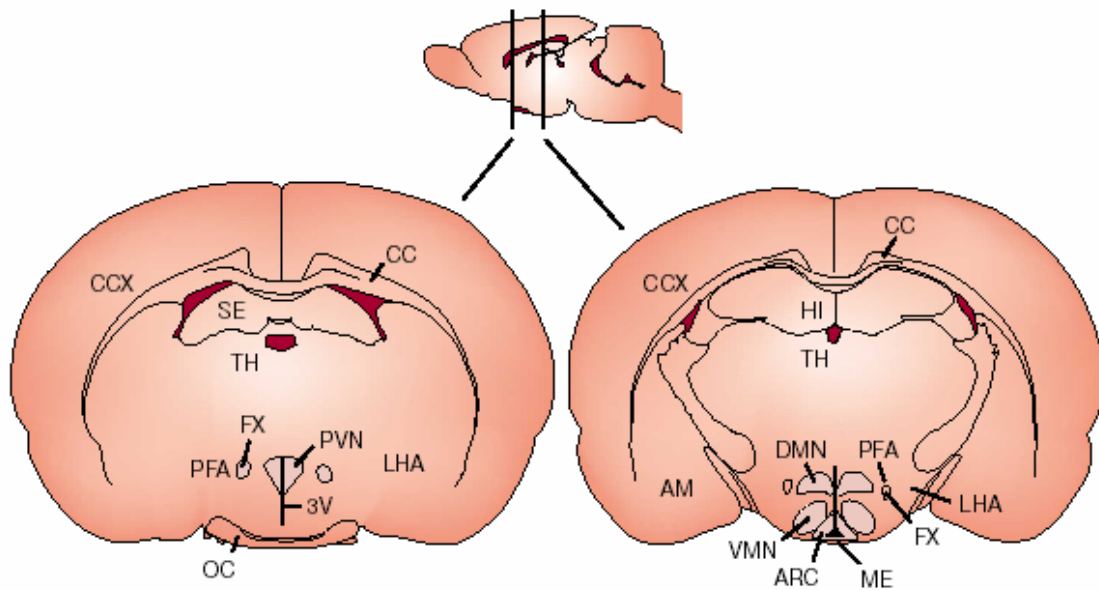


Figura 3: Esquema de un cerebro de rata, mostrando las principales regiones hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta y señalización de adiposidad. Abreviaciones de las estructuras cerebrales: núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), área perifornical (PFA), área hipotalámica lateral (LHA), fórnix (FX), núcleo ventromedial (VMN), núcleo dorsomedial (DMN), amígdala (AM), cuerpo caloso (CC), córtex cerebral (CCX), hipocampo (HI), eminencia media (ME), quiasma óptico (OC), septum (SE), tálamo (TH), tercer ventrículo (3V). *Schwartz MW et al. Nature 2000; 404; 661-671.*

El núcleo arcuato integra señales procedentes de la periferia (es accesible dado que la barrera hematoencefálica es incompleta a este nivel) y del tronco cerebral. En este núcleo existen dos tipos bien diferenciados de grupos neuronales: las neuronas productoras de neuropéptido Y (NPY) y *agouti related peptide* (AGRP), que estimulan la ingesta; y las neuronas productoras de proopiomelancortina (POMC) y *cocaine-and amphetamine-regulated transcript* (CART), que inhiben la ingesta. Estas neuronas se modulan por señales periféricas procedentes del tracto gastrointestinal como la ghrelina, colecistocinina y el péptido YY (PYY) y también por señales que informan sobre la adiposidad como la leptina y la insulina. En concreto la ghrelina actúa a través de la estimulación de las neuronas productoras de NPY, y la leptina y la insulina inhiben las neuronas productoras de NPY/AGRP, y a la vez estimulan las productoras de POMC/CART.

El núcleo del tracto solitario integra información del tracto gastrointestinal, tanto aquella que hace referencia a aspectos mecánicos como la distensión gástrica, como la que aportan diversas hormonas procedentes del tubo digestivo como la colecistocinina o el PYY. Esta información le llega a través del nervio vago y de fibras aferentes vía médula espinal procedentes del tracto gastrointestinal superior (53).

Por su parte el núcleo paraventricular integra señales procedentes del núcleo arcuato, del área hipotalámica lateral (productora de *melanin-concentrating hormone* (MCH)), del núcleo del tracto solitario, del córtex y el sistema límbico y de la amígdala (56-60) (Figura 4).

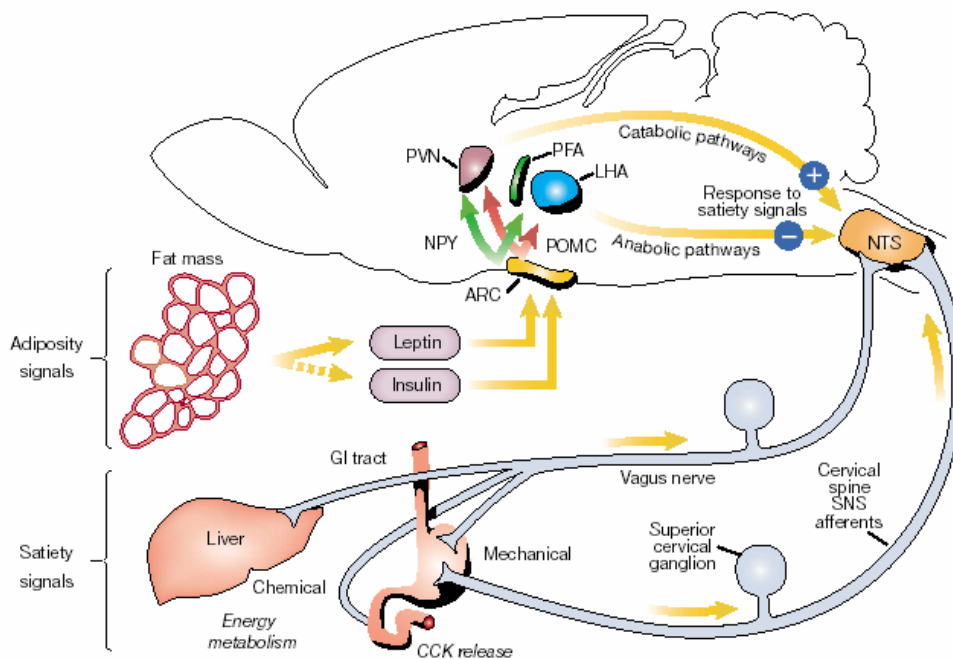


Figura 4: Modelo neuroanatómico de las vías por las cuales las señales de adiposidad, leptina e insulina, interactúan con los circuitos centrales autónomos regulando el tamaño de la ingesta. Schwartz MW et al. Nature 2000; 404; 661-671.

Abreviaciones: núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), neuropéptido Y (NPY), área perifornical (PFA), área hipotalámica lateral (LHA), proopiometanocortina (POMC), núcleo del tracto solitario (NTS), colecistocinina (CCK), sistema nervioso central (SNS), gastrointestinal (GI).

3.2.1.2. Señales periféricas de adiposidad

Tanto la leptina como la insulina tienen receptores a nivel del núcleo arcuato y se secretan en proporción directa a la masa grasa.

La leptina es secretada por los adipocitos. Se encuentra disminuida en situaciones de ayuno, y produce saciedad al estimular las neuronas anorexígenas (POMC/CART) e inhibir las orexígenas (NPY/AGRP) (53-55) (Figura 5).

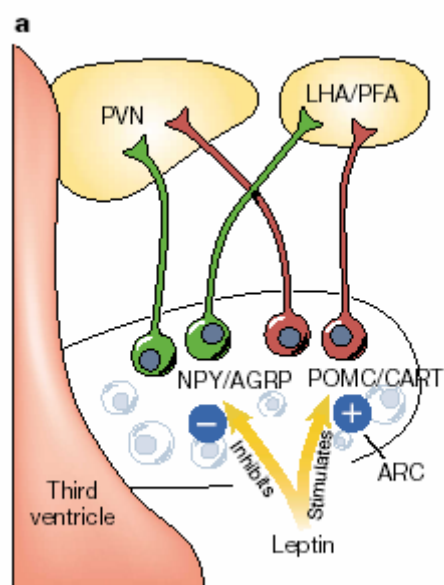


Figura 5. Neuronas NPY/AGRP y POMC/CART en el núcleo arcuato, adyacente al tercer ventrículo. Son las neuronas de primer orden en la respuesta hipotalámica a las señales de adiposidad circulantes insulina y leptina. Estas neuronas proyectan hacia el núcleo paraventricular (PVN), área hipotalámica lateral (LHA) y área perifornical (PFA), donde están localizadas neuronas de segundo orden involucradas en la regulación de la ingesta y homeostasis energética. *Schwartz MW et al. Nature 2000; 404: 661-671.*

Abreviaciones: núcleo paraventricular (PVN), área hipotalámica lateral (LHA), área perifornical (PFA), neuropéptido Y (NPY), *agouti related peptide* (AGRP), proopiomelanocortina (POMC), *cocaine-and amphetamine-regulated transcript* (CART), núcleo arcuato (ARC).

Se considera que la leptina juega un papel importante en la regulación del balance energético, particularmente en la respuesta del organismo al ayuno (61).

Una dieta hipocalórica causa inicialmente una rápida disminución en los niveles de leptina que se hace más marcada con la progresiva pérdida de masa grasa (62-64). La disminución de la liberación de leptina al sistema nervioso central (SNC) altera el balance de varios neurotransmisores hipotalámicos, dando lugar a un aumento compensador del apetito y de la ingesta (53). Esta disminución de la actividad de la leptina en el SNC puede estar provocada también por mutaciones que inactiven a la leptina (65, 66) o su receptor (67). Los individuos que tienen estas mutaciones presentan hiperfagia y obesidad.

Los individuos obesos tienen niveles altos de leptina, que se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal (IMC). Se ha propuesto que la resistencia a la acción de la leptina en el SNC y, por tanto, la disminución de la saciedad resultante de esta resistencia podría conducir a la obesidad (68). De hecho, ensayos clínicos han demostrado que la administración de leptina a sujetos obesos tiene escasa repercusión sobre el peso (69, 70).

3.2.1.3. Señales periféricas de saciedad

En los últimos años se han descrito una serie de hormonas sintetizadas en el tracto gastrointestinal con acción a nivel del sistema nervioso central, de forma que ya se considera como un nuevo eje hormonal: cerebro-gastrointestinal.

Después de una ingesta, los nutrientes pasan al estómago y al intestino, y se liberan una serie de señales gastrointestinales. Estos péptidos y otras señales actúan para optimizar el proceso digestivo, y algunos actúan como señales saciantes, entre los que se encuentran el PYY, el polipéptido pancreático (PP), el *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), la colecistocinina (CCK) y la oxintomodulina (Figura 6).

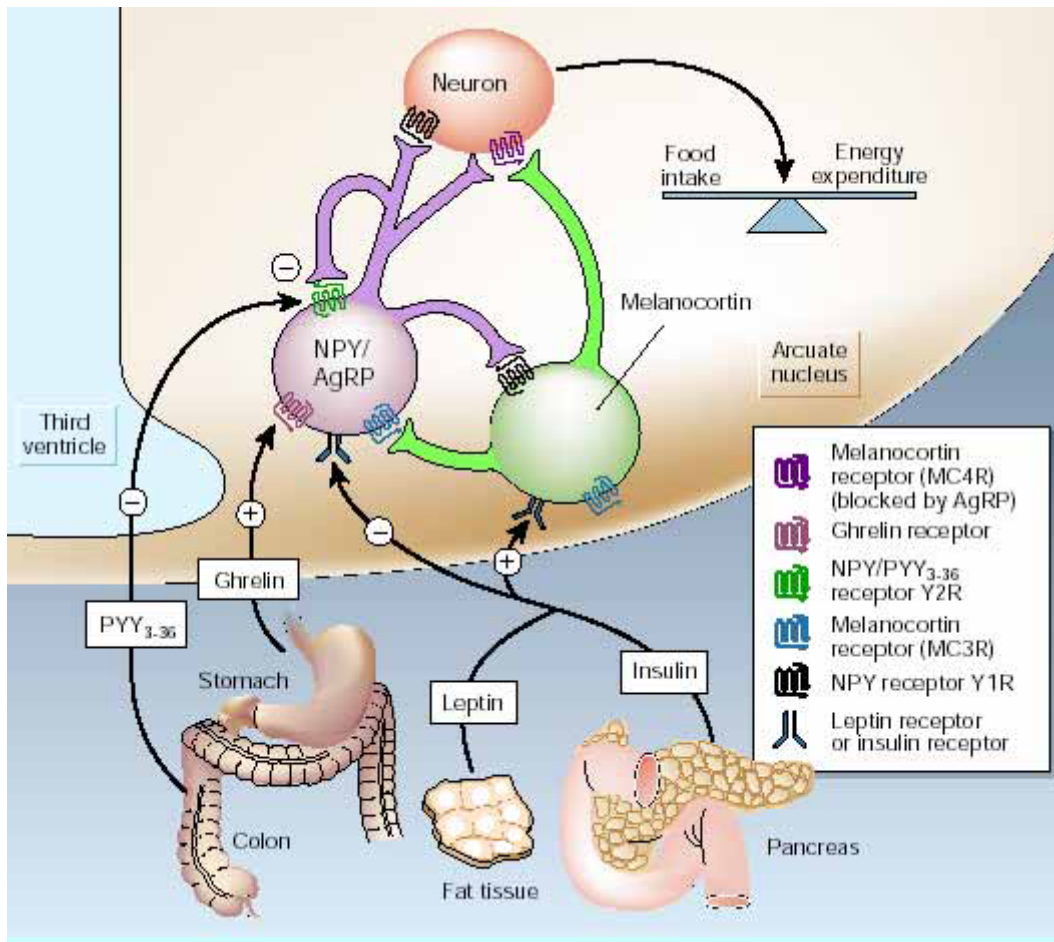


Figura 6: Hormonas que controlan la ingesta. La leptina y la insulina circulan en la sangre a concentraciones proporcionales a la masa grasa. Disminuyen la ingesta inhibiendo neuronas (centro) que producen neuropéptido Y (NPY) y *agouti related peptide* (AGRP), mientras que estimulan neuronas productoras de melanocortina en el núcleo arcuato. NPY y AGRP estimulan la ingesta y melanocortina la inhibe a través de otras neuronas (arriba). La activación de neuronas productoras de NPY/AGRP inhibe las neuronas productoras de melanocortina. La ghrelina estimula el apetito a través de la activación de las neuronas productoras de NPY/AGRP y el péptido YY (PYY) las inhibe disminuyendo así el apetito. *Schwartz MW et al. Nature 2002; 418: 595-597.*

El PYY, el PP y NPY comparten la misma estructura proteica terciaria con forma de U. Además, la secuencia de aminoácidos es bastante parecida. Todos tienen 36 aminoácidos y contienen varios residuos de tirosina. Su actividad biológica es dependiente de una amidación en el extremo C-terminal. Sin embargo, hay importantes diferencias estructurales entre PYY y PP. El extremo N terminal de PYY es muy diferente del de PP, permitiendo a PYY (y no a PP) pasar la barrera hematoencefálica. Además el PYY, a

diferencia del PP, está presente en dos formas, PYY₍₁₋₃₆₎ y PYY₍₃₋₃₆₎. El PYY₍₃₋₃₆₎ es la forma circulante predominante.

El PYY se secreta en todo el tracto gastrointestinal tras la ingesta, pero particularmente en la porción final. Prácticamente no se secreta en el estómago, se secreta en mayor proporción en duodeno y yeyuno, aun más en ileón y colon y en una gran proporción en el recto. Los niveles de PYY alcanzan una meseta a las 1-2 h post-ingesta. El pico de PYY está influenciado por el número de calorías y la composición de la ingesta. Para un mismo número de calorías, los niveles de PYY son más altos si la dieta es rica en grasa, que si predominan los hidratos de carbono o las proteínas. Otros estímulos para el PYY son el ácido gástrico, la CCK y las sales biliares, aunque no la distensión gástrica. El inicio de su secreción ocurre incluso antes de que los nutrientes hayan llegado a las partes más distales del tracto gastrointestinal donde el PYY se secreta en mayor proporción. Por este motivo se cree que su secreción puede depender de reflejos nerviosos, posiblemente a través del nervio vago. Existen otros factores que influyen en los niveles de PYY. El IGF-1, la bombesina, y el *calcitonin-gene-related peptide* aumentan los niveles de PYY, y son disminuidos por el GLP-1 (59).

Son muchos los efectos conocidos del PYY a nivel del tracto gastrointestinal. La administración de PYY aumenta la absorción de fluidos y electrolitos a nivel del íleon después de una ingesta, y retrasa las secreciones gástrica y pancreática, el vaciamiento de la vesícula biliar y el vaciamiento gástrico. Cuando el PYY se administra de forma periférica provoca una reducción del gasto cardíaco acompañado de vasoconstricción. A nivel renal, causa una disminución de la tasa de filtración glomerular, una reducción en la aldosterona y de la actividad renina plasmática. Por otra parte provoca una reducción de la lipólisis, secundaria a un efecto directo sobre el tejido adiposo (Tabla 3).

Tabla 3: Efectos de PYY

Íleon	Estómago	Páncreas exocrino	Vesícula biliar	Riñón	T.adiposo	Cardiovascular	SNC
↑ absorción de fluidos	↓ secreción y vaciado	↓ secreción	↓ vaciado	↓ aldosterona ARP, y FG	↓ lipólisis	↓ gasto cardíaco ↑ vasoconstricción	↑ saciedad

NOTA: ARP: actividad renina plasmática, FG: filtrado glomerular, SNC: sistema nervioso central

La administración de la forma PYY₍₃₋₃₆₎ endovenosa a dosis fisiológicas provoca en voluntarios humanos sanos una reducción de la ingesta calórica del 30% (71). Además, la duración de la ingesta y la sensación subjetiva de hambre disminuye, sin una alteración en el vaciado gástrico. Este efecto persiste después de 2 h de haber terminado la perfusión, a pesar de que la concentración circulante de PYY₍₃₋₃₆₎ haya vuelto a los valores basales.

En individuos obesos los niveles de PYY₍₃₋₃₆₎ en ayunas son más bajos que en sujetos delgados y aumentan menos tras la ingesta. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la leptina, la obesidad no se asocia con una resistencia al PYY, dado que la infusión de PYY₍₃₋₃₆₎ a individuos obesos provoca una reducción en la ingesta del 30% al igual que en los individuos con normopeso (72). Esto sugiere que la administración de PYY₍₃₋₃₆₎ podría ser un tratamiento efectivo para la obesidad. De hecho, la administración crónica a ratones produjo una disminución de la ingesta a lo largo de todo el estudio y una disminución del peso (71).

El PP se produce mayoritariamente en el páncreas endocrino, especialmente en la porción duodenal, pero también se encuentra en el páncreas exocrino, colon y recto. La mayoría de las células inmunoreactivas para PP (células PP) se encuentran en la periferia de los islotes pancreáticos. Al igual que el PYY, el principal estímulo para su liberación es la ingesta, de forma directamente proporcional al contenido calórico de la misma. La secreción postprandial de PP es bifásica: en respuesta a la primera comida del día, hay una relativa

pequeña primera-fase de liberación de PP, pero la contribución de esta primera fase aumenta con las sucesivas comidas. Sin embargo, la secreción en conjunto para unas mismas calorías no se modifica (73). Otros estímulos que también influyen sobre la liberación de PP son por ejemplo, la distensión gástrica, el tono vagal, o la estimulación adrenérgica (ej. debida a ejercicio o por hipoglucemia). Las hormonas pancreáticas y gastrointestinales también pueden regular los niveles circulantes de PP. La ghrelina, la motilina y la secretina estimulan la liberación de PP, mientras que la somatostatina y sus análogos reducen significativamente los niveles de PP. Estas fluctuaciones en los niveles de PP se producen sobre unas variaciones circadianas en las que los niveles de PP alcanzan su punto más bajo a las 0200 h y su pico a las 2100 h (73).

En voluntarios sanos la perfusión de PP produjo una disminución de la ingesta y este efecto se prolongó durante las siguientes 24 h, produciendo una reducción del 25% de la ingesta acumulada durante estas 24 h (74). Sin embargo, las concentraciones de PP que se alcanzaron durante esta perfusión de PP fueron 3 veces mayores que los niveles postprandiales fisiológicos de PP.

En el tracto gastrointestinal, el PP inhibe el vaciado gástrico, la secreción pancreática exocrina, y la motilidad de la vesícula biliar (75).

La secreción de PP está alterada en algunos síndromes que asocian trastornos en el comportamiento alimentario (76-80). Se ha descrito una disminución de la secreción postprandial de PP en la obesidad mórbida (77), mientras que en la anorexia nerviosa los niveles postprandiales son mayores que en sujetos sanos (78, 79). En individuos sanos, la administración de PP produjo una disminución de la ingesta (80), por lo que se ha propuesto al PP como una opción terapéutica en la obesidad (74).

El GLP-1 y la oxintomodulina (OXM) son productos del gen del preproglucagón, que se expresa en las células del SNC y en las células L del intestino delgado y del páncreas.

Estas células L pueden también coexpresar otros péptidos anorexígenos como el PYY₍₃₋₃₆₎ y la CCK. La OXM y el GLP-1 se secretan rápidamente después de la ingesta en proporción al número de calorías ingeridas. Se conoce que ambas actúan como señales de saciedad, afectando tanto a la ingesta a corto plazo como posiblemente influenciando el peso corporal a más largo plazo. En humanos la administración endovenosa de GLP-1 disminuye la ingesta y da sensación de saciedad. Un reciente metanálisis sobre el efecto de la infusión de GLP-1 demostró una media en la reducción calórica del 11.7%. Esta reducción en las calorías es dosis dependiente, y ocurre tanto en individuos obesos como con normopeso (81). En los individuos obesos el GLP-1 está disminuido, y la pérdida de peso normaliza sus niveles (82). Un GLP-1 bajo podría por tanto contribuir a la patogénesis de la obesidad y, su substitución, podría restaurar la saciedad. Sujetos obesos que recibieron GLP-1 subcutáneo durante 5 días justo antes de las comidas redujeron su ingesta calórica en un 15% y perdieron 0,5 Kg de peso (83).

La OXM también tiene efectos anorexígenos en humanos. Una infusión de OXM a individuos sanos con normopeso produjo una reducción inmediata de la ingestión de calorías del 19,3% y fue efectiva en reducir la ingesta hasta 12 h después de la infusión. Parte de su efecto anorexígeno puede ser a través de la supresión de los niveles plasmáticos de ghrelina. La administración de OXM (a niveles suprafisiológicos) redujo la ghrelina circulante en un 15-20% en ratones y un 44% en humanos (84). Es posible que la liberación postprandial de OXM pueda contribuir a la inhibición fisiológica de la ghrelina tras la ingesta. Sin embargo, los efectos a largo plazo de la OXM sobre el peso y las concentraciones de OXM y sus efectos sobre la ingesta en individuos obesos no se conocen aún.

Además de su efecto anorexígeno, el GLP-1 y la OXM también aumentan la secreción postprandial de insulina, inhiben la secreción ácida gástrica y reducen la motilidad

gástrica. La infusión de GLP-1 endovenosa es capaz de normalizar la glicemia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de larga evolución que no se controlan con sulfonilureas (85). De hecho ya se ha comercializado en algunos países un análogo de GLP-1 para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 que reduce la hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) y el peso en estos pacientes. También se va a comercializar un inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). Esta enzima corta los dos residuos de aminoácidos del extremo N-terminal del GLP-1 inactivándolo, por lo que su inhibidor prolonga la actividad biológica del GLP-1.

La CCK también se secreta tras la ingesta, y aunque está ampliamente distribuida en el tracto gastrointestinal, su producción se concentra mayoritariamente en el duodeno y el yeyuno. La CCK estimula la secreción pancreática exocrina y la secreción de bilis contribuyendo a la digestión. Además, estimula la motilidad intestinal e inhibe el vaciado gástrico (86). La CCK también produce sensación de saciedad y, su inyección bloquea el efecto orexígeno de la ghrelina (87), aunque su corta vida media de 1-2 minutos le impide ser efectiva para reducir el volumen de la ingesta si se administra más de 15 minutos antes de la comida (88). Por todo esto, la utilidad de la CCK como un potencial tratamiento antiobesidad es aún dudosa.

3.2.1.4. La ghrelina como señal de hambre

La ghrelina es la primera hormona periférica conocida con efecto orexígeno. Actúa estimulando las neuronas productoras de NPY/AGRP del núcleo arcuato. Se trata de un péptido de 28 aminoácidos (89) secretado en su mayoría por las células oxínticas del estómago y, en menor proporción en el intestino, páncreas, riñón, placenta, hipófisis e hipotálamo (90-94). Es el primer péptido natural acilado (Figura 7).

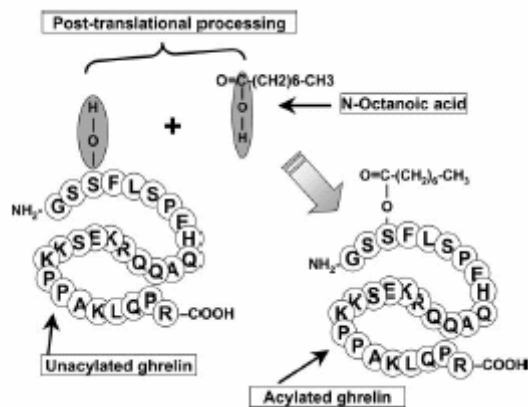


Figura 7: Estructura de la ghrelina. Van der Lely et al. *Endocr Rev* 2004; 25: 426-457.

Tiene un grupo n-octanoil (ácido graso de 8 carbonos unido covalentemente) a nivel de la serina 3, que es esencial para su bioactividad ya que le permite cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a su receptor específico (GHS1a: receptor de los secretagogos sintéticos de la GH (GHS) subtipo 1a). Concretamente, el centro activo necesario para la activación del receptor es la secuencia Gly-Ser-Ser(n-octanoyl)-Phe. Existe una variante, la Des-Gln 14-ghrelina que tiene la misma acilación en la serina 3 y es homóloga a la ghrelina excepto por que le falta una glutamina. Es el resultado de un ensamblaje alternativo (*alternative splicing*) del gen de la ghrelina y tiene la misma actividad que ella (95). No obstante, el 75 % de la ghrelina circula en forma no acilada. Al principio se creía que era una forma inactiva pero hoy en día se le conocen otras funciones no endocrinas tales como cardiovasculares y antiproliferativas. Probablemente estas funciones se realicen uniéndose a otros subtipos de receptores diferentes a GHS1a. (96, 97) (Figura 8).

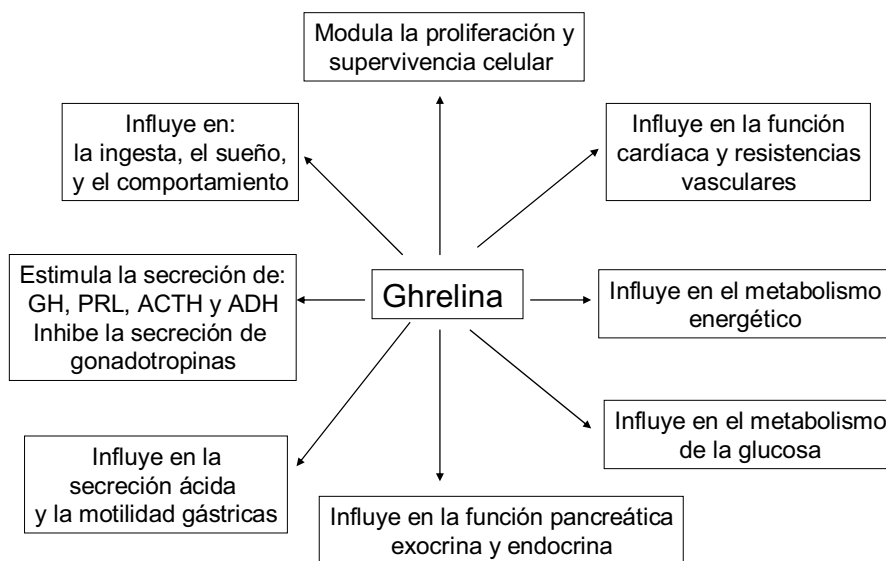


Figura 8: Actividades biológicas conocidas de la ghrelina. Algunos de los efectos mostrados se cree que son mediados a través de hormonas hipofisarias o circuitos hipotalámicos; otros como los efectos sobre el sistema cardiovascular, parecen ser directos. Modificado de :*Van der Lely et al. Endocr Rev 2004; 25: 426-457.*

Abreviaciones: hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), corticotropina (ACTH), desmopresina (ADH).

Se conocen dos subtipos del receptor GHS, el 1a y el 1b. El GHS1a se encuentra en las neuronas del núcleo arcuato (área crucial en la regulación del apetito); en la adenohipófisis (especialmente en las células somatotropas), en áreas del sistema nervioso central extrahipotalámicas y órganos como estómago, intestino, páncreas, riñón, corazón y aorta. También se ha identificado en diferentes tumores pituitarios, de mama, pulmón, estómago y páncreas. (98-101). El subtipo GHS1b no se activa mediante los secretagogos sintéticos de GH (99). Esta distribución de los receptores ayuda a explicar no sólo el efecto de los GHS y de la ghrelina en la liberación de GH sino también en otras actividades biológicas endocrinas y no endocrinas, algunas de ellas relacionadas con la regulación del balance energético.

En humanos, en situación de balance energético positivo (obesidad, postingesta) las concentraciones de ghrelina están disminuidas (98,102-107).

En sujetos sanos, la secreción de ghrelina sigue un ritmo circadiano mostrando un incremento antes de cada comida y una disminución de las concentraciones tras la ingesta. A este incremento preprandial se le ha atribuido el papel de señal para iniciar la ingesta (108). El efecto supresor de la ingesta no parece mediado por el aumento de insulinemia postprandial, ya que la reproducción del aumento de insulinemia postprandial mediante la infusión subcutánea de insulina no modifica las concentraciones de ghrelina (107). Esta supresión postprandial, por tanto, parece más bien mediada por el efecto local de los nutrientes a su paso por el intestino. Durante la noche, la secreción de ghrelina presenta un aumento máximo a las dos horas de la madrugada (105).

En pacientes obesos, la ghrelina no disminuye después de la ingesta (109) tal como ocurre en sujetos sanos. No se sabe si es porque las concentraciones ya están tan bajas que no pueden disminuir más, o bien porque existe una disfunción postprandial de la secreción de esta hormona que impide que sus concentraciones disminuyan, contribuyendo por tanto a la falta de saciedad postprandial. Por el contrario, la pérdida de peso con dieta aumenta las concentraciones de ghrelina, especulándose que esta hormona podría ser la causante de la recuperación del peso a largo plazo (104, 110). La pérdida de peso utilizando la banda gástrica ajustable también produce, según algunos trabajos, aumento de las concentraciones de ghrelina (111, 112) y, según otros, no (113). En cambio, tras el *by-pass* gástrico, en la mayoría de estudios, las concentraciones de ghrelina persisten bajas y sin ritmo circadiano, contribuyendo a la sensación de saciedad y a reducir voluntariamente el aporte de alimentos hipercalóricos (104, 114, 115). Sin embargo, en un estudio reciente se ha podido observar que las concentraciones de ghrelina aumentan a los 6 y 12 meses tras la cirugía y además lo hacen de manera igual en el grupo intervenido y en el grupo control

que sólo fue tratado con dieta (116). Otros autores argumentan que el efecto del *by-pass* gástrico sobre las concentraciones de ghrelina depende del estado dinámico de la pérdida de peso. Así, mientras los pacientes están en fase de pérdida de peso, las concentraciones de ghrelina aumentan respecto a las concentraciones basales, en cambio, en aquellos en que el peso ya se ha estabilizado, las concentraciones de ghrelina son parecidas a las previas (117). Estas observaciones podrían explicar las discrepancias entre los dos estudios mencionados.

En situaciones de balance energético negativo (ayuno, anorexia nerviosa, bulimia, cáncer o caquexia cardíaca) las concentraciones de ghrelina están elevadas como intento de preservación del estado catabólico (104, 108, 118-123). En la anorexia nerviosa, las concentraciones de ghrelina están altas y no disminuyen tras la ingesta (124). Cuando los pacientes recuperan parcialmente el peso, las concentraciones descienden y vuelven a la normalidad. Se ha sugerido que en la anorexia nerviosa puede haber un cierto grado de resistencia a la ghrelina que justificaría el hecho de que a pesar de tener las concentraciones elevadas no tienen apetito (125). En la bulimia, las concentraciones pueden oscilar en función de los episodios de atracones y de fases purgativas, de forma que los pacientes con bulimia de tipo purgativo tienen concentraciones más elevadas de ghrelina que aquellos con bulimia de tipo no purgativo y que individuos sanos, a pesar de tener parámetros nutricionales similares. Además, tanto para la anorexia como para la bulimia, en aquellos pacientes que alternan atracones con fases purgativas existe una correlación entre las concentraciones de ghrelina y la frecuencia de estos episodios (126). Finalmente, aunque un estudio inicial apuntaba a que las concentraciones de ghrelina eran iguales en ambos sexos, estudios más recientes muestran que están más elevadas en mujeres, especialmente en la fase folicular del ciclo menstrual (127).

3.3. NEUROPEPTIDOS HIPOTALÁMICOS Y REGULACIÓN DEL APETITO EN EL SÍNDROME DE PRADER-WILLI: POSIBLES ALTERACIONES

3.3.1. Alteraciones en el sistema nervioso central

Se han llevado a cabo múltiples estudios para investigar cuáles son las posibles alteraciones en el hipotálamo que conllevan la hiperfagia en el SPW. En estudios post mórtem, no se ha podido comprobar ninguna alteración en las neuronas NPY/AGRP y POMC/CART (128). En cambio, se ha podido observar una reducción del número total de neuronas (38%) y, concretamente, de las que producen oxitocina (42%), en el núcleo PVN, mientras que el número de neuronas que fabrican vasopresina se mantiene constante (20, 21). Otro estudio piloto no cuantitativo ha demostrado, en pacientes con SPW, una producción normal de péptido orexígeno MCH (*melanin concentrating hormone*) por parte del LHA, el área perifornical y la zona incierta del hipotálamo (129). Por otra parte, en el hipotálamo anterior y medial se encuentra una gran cantidad de receptores A del ácido gammaaminobutírico (GABA). En el SPW se han descrito valores plasmáticos elevados de GABA en comparación con sujetos control de la misma edad y peso corporal (130). Los genes que codifican para las subunidades beta-3, alfa-5 y gamma-3 del receptor GABA-A se localizan en el brazo largo del cromosoma 15, que está delecionado o no expresado en la mayoría de pacientes con SPW. Sería lógico pensar que estos pacientes podrían tener una alteración en los receptores GABA-A hipotalámicos que produjera una elevación de los niveles plasmáticos de GABA relacionada con la falta de saciedad (130, 131).

3.3.2. Alteraciones a nivel periférico

Leptina

Hasta ahora no hay evidencia de que los pacientes con SPW tengan un déficit de leptina. Los niveles de leptina en 13 mujeres con SPW fueron superiores a los de un grupo de mujeres control, pero iguales después de ajustarlos por contenido de tejido adiposo y edad. Por tanto, no parece que un defecto en la producción de leptina sea el responsable de la hiperfagia y la obesidad en estos pacientes (132).

Insulina

La insulina, tal y como se ha mencionado anteriormente, puede actuar en el SNC produciendo saciedad. En el SPW existe una cierta hipoinsulinemia en relación con el grado de adiposidad que, aunque no esté comprobado, podría hipotéticamente contribuir a la falta de saciedad. La distribución de la grasa característica del SPW, con mayor disposición en el tejido subcutáneo que en el tejido visceral, podría explicar la relativa sensibilidad a la insulina de los pacientes con SPW, en comparación con sujetos obesos sin SPW (132).

PYY

Recientemente, se ha intentado evaluar el posible efecto del PYY en la falta de saciedad de los pacientes con SPW. Hasta el momento, existen 3 estudios al respecto. En uno de ellos se observan valores en ayunas de PYY disminuidos en niños (133). Los otros dos estudios, realizados por un mismo grupo y en sujetos adultos, refieren valores basales y postprandiales normales de PYY y, una ausencia de relación con los valores de ghrelina (134,135). Por tanto, la información sobre los niveles de PYY en pacientes adultos con SPW es aún insuficiente.

PP

En individuos con SPW, los valores basales están disminuidos, así como la respuesta postprandial (35, 36, 76), con lo que esta alteración podría contribuir a explicar la hiperfagia de este síndrome. A diferencia de lo que ocurre en individuos sanos (74), la infusión aguda de PP a altas dosis en pacientes con SPW no consiguió disminuir la ingesta (136). No obstante, los mismos autores repitieron el estudio utilizando dosis de PP más fisiológicas y repetidas durante dos días, y consiguieron, de esta manera, una disminución marcada de la ingesta sólo en las mujeres con SPW (80). En resumen, se puede afirmar que esta alteración, por sí sola, no explica la falta de saciedad de estos pacientes.

GLP-1

Hasta el momento existe un único estudio que ha evaluado los valores plasmáticos basales de GLP-1 en el SPW, habiendo resultado éstos normales (137). No existen trabajos que hayan evaluado este mismo péptido en estado postprandial en el SPW.

Oxintomodulina

Tampoco existen estudios que hayan evaluado los valores de OXM en el SPW.

CCK

En el SPW, la aparición de sensación de saciedad es considerablemente más lenta y, por tanto, sería lógico pensar que pudiera existir una alteración en la liberación de CCK. Existen pocos estudios al respecto y con resultados dispares. Varios de ellos observan que los valores basales de CCK en individuos con SPW son normales (36, 138, 139). En situación postprandial, mientras que un estudio refiere una elevada secreción de CCK como respuesta a una comida mixta (36), otro refiere una falta de correlación positiva entre los valores de ácidos grasos libres en plasma y los de CCK después de la ingesta de una comida rica en grasas (139). Por tanto, se requieren más estudios para aclarar este aspecto.

Ghrelina

El SPW es el único modelo de obesidad que cursa con valores elevados de ghrelina (134, 140-143), que podrían contribuir a explicar la falta de saciedad presente en este síndrome. Además, en varios estudios se ha demostrado una disminución de los valores de ghrelina después de la ingesta (135, 142, 144). Existe un único estudio en que se observó una ausencia de supresión de los valores de ghrelina después de una comida, pero el estudio es incompleto, ya que se determinaron sólo los valores de ghrelina inmediatamente después de la ingesta, lo que podría explicar la ausencia de supresión al no haber explorado la secreción de ghrelina en un período más tardío (141).

De todas maneras, parece que la ghrelina no es el único causante de la falta de saciedad en este síndrome, ya que tras el bloqueo de la secreción de ghrelina con una infusión endovenosa de somatostatina, los pacientes con SPW siguen presentando más hiperfagia que el grupo control (134). En este mismo estudio, los valores del péptido anorexígeno PYY disminuyeron después de la administración de somatostatina, por lo que la disminución de este péptido que produce saciedad podría haber confundido los resultados.

3.4. EL ADIPOCITO Y LA ADIPONECTINA: UN DIÁLOGO ENTRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA, LA INFLAMACIÓN Y LA ARTERIOSCLEROSIS

El adipocito es una célula peculiar en muchos aspectos. Almacena el exceso de energía en forma de lípidos y es, por tanto, capaz de cambiar su tamaño en concordancia con los cambios metabólicos. Esta habilidad, da al tejido adiposo una capacidad ilimitada para crecer, siendo el único tejido del organismo capaz de aumentar de forma tan drástica su tamaño sin una transformación del fenotipo celular. El adipocito es un participante activo en la homeostasis energética; por una parte, es capaz de recibir señales procedentes del

SNC, y por otra, emitir una serie de señales que actuarán, entre otros lugares a nivel del SNC. Estas señales se conocen como adipocitocinas y son además de la leptina, de la que ya se ha comentado su papel en el metabolismo: la adiponectina y la resistina, que también intervienen en la homeostasis energética; el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), moléculas reguladoras del sistema inmunitario; colágeno tipo IV, componente de la matriz extracelular; lipoproteína lipasa (LPL), que interviene en el metabolismo de las lipoproteínas; la α 1 glicoproteína ácida, el amiloide sérico A₃, la pentraxina PTX-3 y la proteína 24p3, moléculas reguladoras de la respuesta de fase aguda; y el factor de crecimiento endotelial vascular y la monobutirina, como reguladores de los vasos; y por último la proteína estimuladora de la acilación (ASP: *acylation stimulation protein*), derivada del factor del complemento C3a, el factor B, y la adiposina, también fabricados por los adipocitos, que intervienen en la regulación de la lipogénesis/lipólisis (145).

En la obesidad, coexiste el hecho de un mayor número de adipocitos y el de su mayor tamaño. Estos adipocitos grandes tienen un perfil secretor y una homeostasis celular alterada en comparación con los adipocitos de menor tamaño. Se cree que el aumento del porcentaje de estos adipocitos grandes en la obesidad pueda contribuir, en parte, a algunos de los problemas asociados a la misma (146).

3.4.1. Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30-KDa con niveles circulantes aproximadamente de dos a tres veces superiores en mujeres que en hombres. Su estructura molecular tiene cierta similitud con el factor del complemento C1_q. En el suero podemos encontrar la adiponectina en formas de bajo peso molecular, formando dímeros de trímeros o bien como formas de alto peso molecular, que consisten en moléculas de hasta seis trímeros. Existe una tercera forma conocida como trímero globular, consecuencia de una rotura de

la molécula en su extremo amino terminal. No se sabe con exactitud si es un intermediario fisiológico pero tiene una actividad farmacológica muy potente (147-150). Al contrario de lo que ocurre con la leptina, los niveles de adiponectina son inversamente proporcionales al IMC, siendo por ello bajos en individuos obesos, y elevados en caso de disminución de peso (151, 152).

Los niveles de adiponectina también están disminuidos en diversas situaciones que forman parte del síndrome metabólico la diabetes tipo 2, la obesidad de predominio abdominal, la hiperlipidemia y los niveles bajos de HDL (153).

Existe una creciente evidencia de que la adiponectina está involucrada tanto en el metabolismo de los lípidos como de los hidratos de carbono. Además, la adiponectina parece tener acciones directas e indirectas que podrían ser consideradas como protectoras de la enfermedad cardiovascular (154, 155). Se ha sugerido que los niveles bajos de adiponectina observados en individuos obesos (151) están involucrados en el desarrollo de arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular (156, 157). Por una parte, hay estudios que demuestran que la adiponectina tiene acciones directas sobre el endotelio vascular actuando de protector frente a la enfermedad cardiovascular (158, 159) y, por otra parte, el ratón *knockout* para adiponectina tiene un aumento de la respuesta inflamatoria frente al daño vascular (160). También, la administración de adiponectina previene la arteriosclerosis en el ratón apoE-deficiente (modelo de hiperlipemia que desarrolla arteriosclerosis precoz) (161, 162).

Con respecto a los lípidos, las concentraciones de adiponectina se correlacionan negativamente con las concentraciones de triglicéridos y positivamente con las concentraciones de HDL (163, 164).

Los niveles de adiponectina se correlacionan positivamente con la sensibilidad a la insulina medida por diferentes métodos: insulina en ayunas, *homeostatic model assessment*

(HOMA), clamp euglicémico-hiperinsulinémico o test de tolerancia endovenosa a la glucosa (163-166). La administración de adiponectina disminuye los niveles de glucosa sin estimular la secreción de insulina tanto en ratones sanos como diabéticos (167). Produce una disminución de la producción hepática de glucosa de forma directa (168), y además aumenta la inhibición de la producción hepática de glucosa por los hepatocitos inducida por la insulina (169). Por otra parte, se asocia con una disminución del depósito de triglicéridos en el hígado y en músculo esquelético, y con un incremento de la oxidación de lípidos en el músculo (169). Estos son algunos de los mecanismos propuestos por los que la adiponectina puede disminuir la resistencia a la insulina.

3.4.2. Inflamación

Es conocido que la obesidad se asocia a un aumento de la activación de la respuesta inflamatoria innata. Algunos de los mediadores de inflamación son producidos también en los adipocitos como el TNF- α y la IL-6. Otros en cambio, como la proteína C reactiva (PCR) o la IL-18, no los produce el adipocito.

El TNF- α es una citocina proinflamatoria que ha sido implicada en la patogénesis de la resistencia a la insulina. Se expresa como una proteína de membrana de la superficie celular de 26-kDa que tras una ruptura se convierte en una proteína soluble y biológicamente activa de 17-kDa (170). Se ha observado un aumento de la producción de TNF- α por el tejido adiposo, en modelos de animales obesos y con resistencia a la insulina, y también en humanos (171). Los niveles de ácido ribonucleico mensajero (RNA-m) de TNF- α en el tejido adiposo se correlacionan con el IMC, el porcentaje de grasa y la hiperinsulinemia (172). La pérdida de peso disminuye el TNF- α (172). Se han propuesto varios mecanismos que expliquen el efecto del TNF- α en la resistencia a la insulina ligada a la obesidad. Por una parte, el TNF- α provoca un aumento de la síntesis de ácidos grasos libres en los adipocitos y una desensibilización a la acción de la insulina

en los mismos (173, 174). Por otra, tanto el TNF- α como por la IL-6 provocan una disminución de la síntesis de adiponectina (174).

La IL-6 es otra citocina proinflamatoria que también se ha asociado a la resistencia a la insulina. Se secreta por muchos tipos celulares además de los adipocitos, como las células del sistema inmune, los fibroblastos, las células endoteliales, y las fibras del músculo esquelético. Circula como una proteína glicosilada de entre 22 a 27-kDa (175). La asociación entre la IL-6 y la insulinoresistencia se basa en estudios epidemiológicos y genéticos. Los niveles plasmáticos de IL-6 se correlacionan positivamente con la obesidad y la resistencia a la insulina en humanos (176, 177). Niveles altos de IL-6 predicen el desarrollo de diabetes tipo 2 (178) y de infarto de miocardio (179, 180). La pérdida de peso disminuye de forma significativa los niveles de IL-6 tanto en el tejido adiposo como en el suero (181). Estudios genéticos han demostrado que existe un alto grado de correlación entre la resistencia a la insulina y el polimorfismo -174 G/C del gen de la IL-6 (182). Al igual que ocurre con el TNF- α , la IL-6 aumenta los ácidos grasos libres circulantes producidos por el tejido adiposo (con el consiguiente efecto adverso sobre la sensibilidad a la insulina) y disminuye los niveles de adiponectina (174).

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína de 118-KDa de peso molecular y compuesta de 5 subunidades globulares idénticas (183). Se sintetiza en el hígado, y se encuentra habitualmente en humanos a concentraciones plasmáticas inferiores a 3 mg/L. Sus niveles aumentan durante estados inflamatorios como por ejemplo la artritis reumatoide y la enfermedad vascular periférica o cardiovascular. En tan sólo 24 a 48 horas tras haber ocurrido un daño tisular, la producción de PCR aumenta de forma espectacular llegando a ser 1000 veces superior al nivel basal y continua elevada durante varios días (183-185). Se considera que los valores de PCR elevados son un factor predictivo para enfermedades cardiovasculares, y complementa a los factores de riesgo tradicionales como la obesidad,

el hábito tabáquico, la diabetes mellitus, la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia y la hipertensión arterial tanto en hombres como en mujeres de la población general (186-189). Existe una correlación positiva entre el IMC y los niveles de PCR. La pérdida de peso se asocia con una disminución en los niveles de PCR (190-192). Estudios en gemelos han demostrado que los factores genéticos son responsables de hasta el 40% de las variaciones de la PCR en plasma (193). Además, los niveles de PCR también varían en función de los diferentes polimorfismos en el promotor del gen de la PCR (194).

El sistema del complemento consiste en un conjunto de aproximadamente 30 proteínas plasmáticas y proteínas unidas a membrana (receptores y reguladores) que tienen la función de destruir elementos extraños que puedan entrar en nuestro organismo. El sistema tiene la capacidad única de discriminar entre estructuras propias y no propias (195-197). Aunque el complemento es una línea de defensa importante contra organismos patógenos, su activación de forma inapropiada puede dañar las células del huésped (198). El principal evento en la activación de la cascada del complemento es la activación enzimática del factor C3 en C3a y C3b. Los mecanismos por los cuales el complemento es activado no se conocen con precisión. Al igual que con los anteriores marcadores de inflamación descritos hasta ahora, niveles elevados de C3 se han asociado con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como infarto de miocardio o de padecer hipertensión arterial (199-201).

La IL-18 es una potente citocina proinflamatoria compuesta por una única cadena peptídica de 18-KDa (202). Induce la producción de interferon- γ en las células mononucleares sanguíneas, y aumenta la toxicidad celular de las células NK (*natural killer*) (203). Se trata de una citocina con efectos pleiotrópicos que actúa aumentando tanto la inmunidad innata como la adquirida (204). Además de actuar como una citocina proinflamatoria, induciendo la expresión de moléculas de adhesión, la IL-18 es capaz de

estimular la producción del factor estimulador de colonias por parte de los granulocitos y los macrófagos. También estimula la producción de TNF- α y de sintetasa inducible por óxido nítrico por parte de las células mononucleares y mesenquimales (204). La IL-18 se ha detectado en placas vasculares arterioscleróticas y está probablemente implicada en la aterogénesis (205). Por otra parte, recientemente se ha observado una asociación entre los niveles altos de IL-18 y la presencia de obesidad abdominal (206). Por último, se han encontrado niveles más altos de IL-18 en pacientes con enfermedad coronaria y diabetes mellitus tipo 2, y se considera un predictor de muerte por enfermedad cardiovascular (207, 208). También se han descrito niveles de IL-18 más altos en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, que a su vez están asociados con diversos índices de adiposidad visceral y global, y con resistencia a la insulina (209).

3.4.3. Adiponectina e inflamación en el SPW

Existen dos estudios que investigaron acerca de las concentraciones de adiponectina en el SPW. En uno se encontraron niveles más bajos de adiponectina en este síndrome respecto a los controles (210), y en el otro realizado en niños con SPW no obesos, se encontraron niveles más altos de adiponectina y éstos aumentaban aun más cuando eran tratados con hormona de crecimiento (211). Respecto a la PCR, en el SPW se han publicado cuatro trabajos. En dos de ellos, los pacientes obesos con SPW presentaron niveles más altos de PCR que los individuos obesos sin SPW (212) y que los sanos (213). En el tercer estudio, no se observaron diferencias en los niveles de PCR entre los pacientes obesos con y sin SPW (214) y, en el cuarto, los pacientes con SPW mostraron niveles más altos de PCR y de IL-6 comparado con un grupo control y disminuían tras el tratamiento con GH (215).

Como resumen, en el SPW:

1-La información sobre algunos péptidos involucrados en la regulación del apetito (ghrelina, PYY, adiponectina) y su relación con la ingesta es insuficiente

2-No existen trabajos publicados en los que se haya estudiado C3, IL-18 o TNF- α en ayunas

3-Tampoco existen trabajos publicados en que se haya estudiado algún parámetro inflamatorio en situación postprandial, entre ellos C3, IL-6, IL-18, TNF- α , PCR, y adiponectina.

Por todo ello, nos propusimos investigar todos estos factores en situación de ayunas y en estado postprandial, en este síndrome.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1. Estudio de la ghrelina y peptido YY en pacientes adultos con síndrome de Prader-Willi tanto en ayunas como en periodo postprandial y su comparación con sujetos sanos obesos y con normopeso:**

Los pacientes con síndrome de Prader-Willi se caracterizan, entre otras cosas, por una hiperfagia exagerada y falta de saciedad. Dado que la ghrelina es un péptido que estimula la ingesta y el péptido YY produce saciedad, es de esperar que en estos pacientes la ghrelina se encuentre elevada y el péptido YY disminuido.

- 2. Estudio de diversos conocidos factores de riesgo cardiovascular (adiponectina y citocinas inflamatorias: PCR, C3, TNF- α , IL-6, IL-18) en pacientes obesos con y sin síndrome de Prader-Willi y su comparación con sujetos sanos, tanto en ayunas como en estado postprandial:**

La obesidad se acompaña de un aumento del riesgo cardiovascular por varios factores. Entre ellos, se encuentran los niveles bajos de adiponectina y elevados de citocinas inflamatorias. Dado que la obesidad que presentan los pacientes con síndrome de Prader-Willi es antropométricamente diferente a la obesidad común, es posible que estos dos factores de riesgo vascular también muestren diferencias.

5. OBJETIVOS CONCRETOS

Estudiar las concentraciones de ghrelina, péptido YY, adiponectina y diversas citocinas (IL-6, IL-18, C3, PCR y TNF- α), en pacientes obesos con SPW y compararlo con sujetos obesos apareados por edad, sexo e IMC, y con sujetos sanos con normopeso apareados por edad y sexo, tanto en ayunas como tras la ingesta.

6. RESULTADOS

6.1. ESTUDIO 1: La menor supresión de los niveles postprandiales de ghrelina en el Síndrome de Prader-Willi se asocia a unos niveles de péptido YY en ayunas disminuidos y a una respuesta postprandial truncada

En dicho estudio, participaron 7 pacientes adultos con SPW, 16 sujetos obesos con igual edad, sexo e IMC, y 42 sujetos con normopeso de igual edad y sexo. Sólo 7 de cada grupo participaron en el estudio postprandial.

A todos ellos se les determinaron medidas antropométricas y de la composición corporal mediante impedanciometría bioeléctrica.

Se les realizó una extracción de sangre en ayunas y tras la ingesta de una comida líquida estándar con un total de 750 Kcal (53,2% carbohidratos, 30% grasas, 16,7% proteínas).

Las extracciones tras la ingesta se realizaron cada 15 minutos durante la primera hora y posteriormente cada 30 minutos hasta un total de 6 horas.

En cada muestra de sangre se determinaron: glucosa, insulina, ghrelina y PYY. El IGF-1 sólo se determinó en ayunas.

Resultados principales:

1. Estudio en ayunas

Los niveles de IGF-1 fueron inferiores en los pacientes con SPW que en los sujetos con normopeso (Tabla 1 y Tabla 2). Los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas fueron similares en los 3 grupos. Los niveles séricos de insulina en ayunas y el índice HOMA fueron superiores en los sujetos obesos respecto a los pacientes con SPW y a los sujetos con normopeso (Tabla 1). Los niveles de ghrelina en ayunas fueron superiores en los pacientes con SPW que en los otros dos grupos, y los sujetos obesos mostraron niveles de ghrelina más bajos que los sujetos con normopeso (Tabla 1). Los niveles de PYY en

ayunas fueron más bajos en los pacientes con SPW que en los sujetos con normopeso pero similares a los de los sujetos obesos (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 1. Características antropométricas y bioquímicas de los participantes.

	SPW (n=7)	Obesos (n=16)	Normopeso (n=42)
Sexo (H/M)	6/1	10/6	34/8
Edad (años)	24.3±2.5	26.4±1.1	22.4±1.6
IMC (Kg/m ²)	41.6±4.6*	40.1±4.3*	20.2±1.4
Masa grasa (%)	42.7±2.6*	41.6±2.8*	13.7±1.3
IGF-1 (nmol/L)	11.5±2.4†	19.8±2.4	26.7±0.6
Glucosa (mmol/L)	5.16±0.24	5.26±0.10	5.03±0.13
Insulina (pmol/L)	57.9±9.2	79.9±6.8†¶	31.8±1.6
Homa-IR (mMmU/L)	1.84±0.60	3.58±0.24†¶	1.72±0.12
Ghrelina (pmol/L)	236.5±49.5†	132.8±9.9†¶	182.5±13.4
PYY (pmol/L)	53.2±6.5†	69.3±5.4	84.6±3.9

NOTA: Los resultados están expresados como la media ± error típico de la media.

* P=0.001 y † P< 0.05 vs. sujetos con normopeso, ¶ P< 0.05 vs PWS

IMC: índice de masa corporal . HOMA-IR: *homeostatic model assessment index* (mM mU/L).

Tabla 2. Características antropométricas y bioquímicas de los participantes en el estudio postprandial

	SPW (n=7)	Obesos (n=7)	Normopeso (n=7)
Sexo (H/M)	6/1	6/1	6/1
Edad (años)	24.3±2.5	25.0±1.5	24.1±2.6
IMC (Kg/m ²)	41.6±4.6*	41.1±3.1*	21.5±1.1
Masa grasa (%)	42.7±2.6*	40.4±3.8*	12.3±1.4
IGF-1 (nmol/L)	11.5±2.4†	17.2±3.0	25.0±2.6
Glucosa (mmol/L)	5.16±0.24	4.61±0.27	5.13±0.34
Insulina (pmol/L)	57.9±9.2	58.9±10.4	38.6±5.6
Homa-IR (mMmU/L)	1.84±0.60	1.67±0.29	1.22±0.17
Ghrelina (pmol/L)	236.5±49.5	148.8±16.6	184.5±30.6
PYY (pmol/L)	53.2±6.5†	72.6±7.4	80.1±4.2

NOTA: Los resultados están expresados como la media ± error típico de la media.

* P=0.001 y † P< 0.05 vs. sujetos con normopeso.

IMC: índice de masa corporal. HOMA-IR: *homeostatic model assessment index* (mM mU/L).

2. Estudio postprandial

2.1 Niveles de glucosa e insulina. El área bajo la curva para glucosa (AUC) fue similar en los tres grupos. Sin embargo, el AUC para insulina en los pacientes con SPW y en los sujetos obesos fueron superiores que en los sujetos con normopeso (Tabla 3)

Tabla 3. Área bajo la curva postprandial tras 6 horas (6-h-AUC) de glucosa, insulina y ghrelina en pacientes con SPW, sujetos obesos y con normopeso.

6-h-AUC	SPW (n=7)	Obesos (n=7)	Normopeso (n=7)
Glucosa (mmol/L x min)	2057.6±177.0	1888.8±94.2	1836.3±88.6
Insulina (nmol/L x min)	203.1±18.9*	276.2±110.1*	95.1±17.3
Ghrelina (nmol/L x min)	65.6±6.9†	43.7±4.2	51.5±6.5
PYY (nmol/mL x min)	21.4±1.4*†	29.1±2.7	31.1±1.9

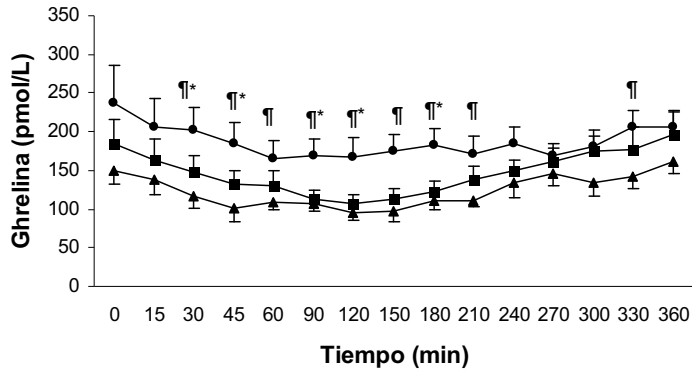
NOTA: Los resultados están expresados como la media ± error típico de la media.

* P< 0.05 vs. sujetos con normopeso, † P<0.05 vs. sujetos obesos

2.2. Niveles de ghrelina. En los tres grupos la ghrelina descendió tras la ingesta (Figura 1). Comparando los tres grupos, los pacientes con SPW mostraron un menor descenso de la ghrelina y, por tanto, el AUC de ghrelina fue superior que la de los sujetos obesos (Tabla 3). Los sujetos obesos y con normopeso mostraron un descenso de la ghrelina y un AUC de ghrelina similares (Tabla 3).

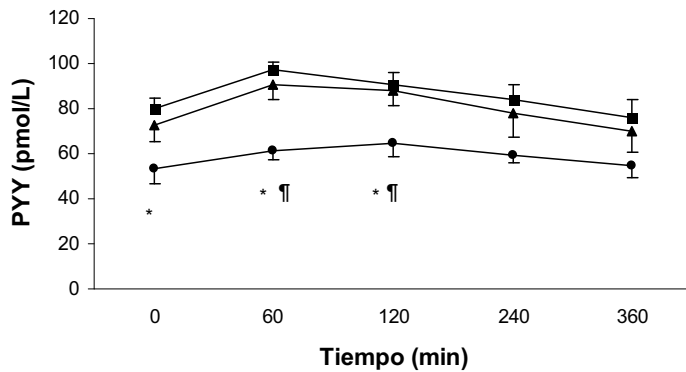
2.3. Niveles de PYY. Observamos una respuesta del PYY truncada en los pacientes con SPW tras la ingesta. En los otros dos grupos, observamos un pico de PYY a los 60 minutos (Figura 2). El AUC de PYY fue menor en los pacientes con SPW que en los otros dos grupos (Tabla 3)

Figura 1. Niveles postprandiales de ghrelina en pacientes con SPW (●), sujetos obesos (▲) y sujetos con normopeso (■).



NOTA: * P<0.05 pacientes con SPW vs. sujetos con normopeso, ¶ P<0.05 pacientes con SPW vs. sujetos obesos.

Figura 2. Niveles postprandiales de PYY en pacientes con SPW (●), sujetos obesos (▲) y sujetos con normopeso (■). * P<0.05 pacientes con PWS vs. sujetos con normopeso, ¶ P<0.05 pacientes con PWS patients vs. sujetos obesos.



NOTA: * P<0.05 pacientes con SPW vs. sujetos con normopeso, ¶ P<0.05 pacientes con SPW vs. sujetos obesos.

2.4. Correlaciones. En los tres grupos, los niveles de PYY en ayunas correlacionaron negativamente con los niveles de ghrelina en ayunas (Figura 3a) y con el AUC de ghrelina

(Figura 3b). El AUC de ghrelina y el AUC de PYY mostraron una tendencia a una correlación negativa ($R=-0,377$, $P=0,092$). En pacientes con SPW, el descenso de ghrelina postprandial mostró una correlación negativa con el incremento de PYY en el minuto 60 (Figura 4a) y en el minuto 120 (Figura 4b). En el análisis de regresión múltiple paso a paso, los niveles de PYY en ayunas fueron predictores del AUC de ghrelina (Tabla 4).

Figura 3. Correlaciones entre niveles en ayunas de PYY y niveles de ghrelina en ayunas (a) y AUC de ghrelina (b) en los tres grupos juntos.

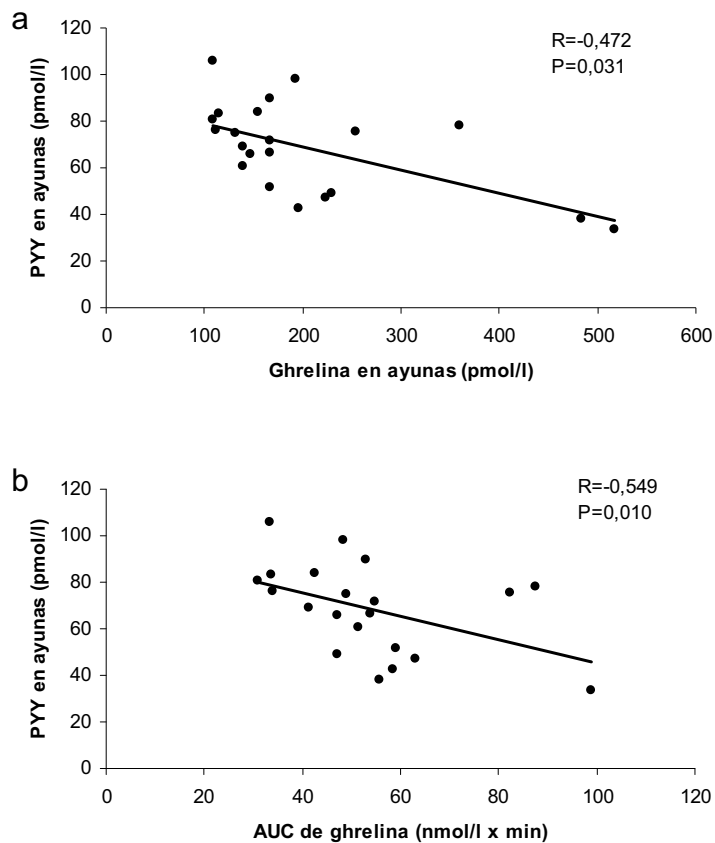


Figura 4. Correlaciones entre el descenso postprandial de ghrelina y el incremento postprandial de PYY en los minutos 60 (a) y 120 (b) en los pacientes con SPW.

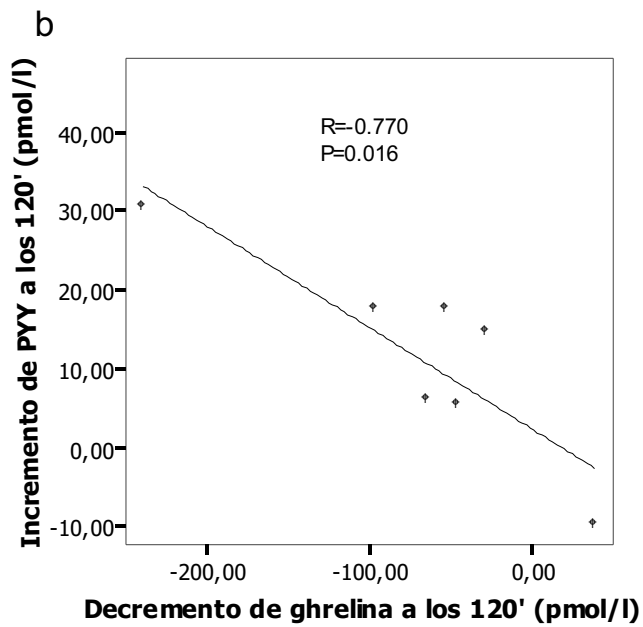
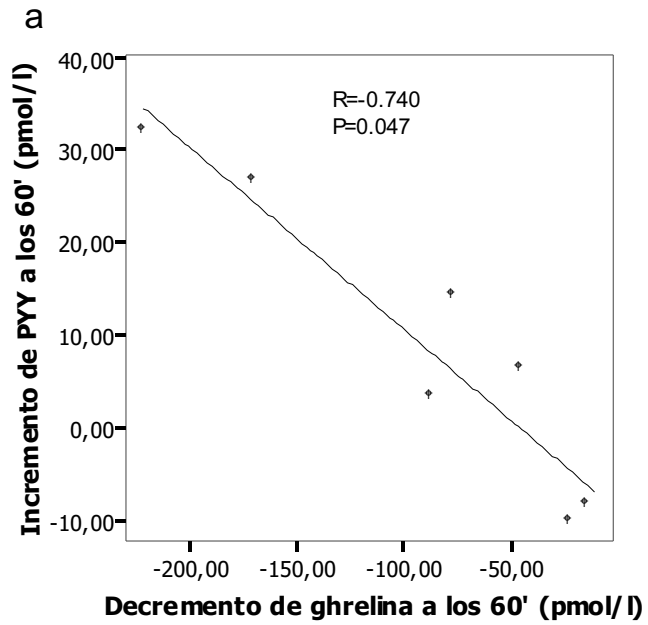


Tabla 4. Análisis de regresión múltiple paso a paso con todos los pacientes (2 modelos diferentes).

Variab les	Modelo 1	Modelo 2
Dependiente	Ghrelina 6-h-AUC	Ghrelina-6h-p-AUC
Independiente	Insulina 6-h-AUC	Insulina en ayunas
	Glucosa 6-h-AUC	Glucosa en ayunas
	PYY 6-h-AUC	PYY en ayunas
Entrados en el modelo	Ninguna	PYY en ayunas*

NOTA: * $\beta=-0.464$, $P=0.034$, 6-h-AUC: AUC postprandial de 6 horas

6.2. ESTUDIO 2. Los niveles postprandiales de adiponectina no parece que contribuyan a la patogénesis de la obesidad en el Síndrome de Prader-Willi

La metodología de este estudio fue similar a la del estudio 1, puesto que se analizaron las muestras extraídas en el estudio 1. En cada muestra se determinaron además los niveles de adiponectina y triglicéridos.

Resultados principales:

1. Estudio en ayunas. Las características antropométricas y bioquímicas de los participantes se muestran en la Tabla 1.

Los niveles de adiponectina fueron inferiores en los pacientes con SPW respecto a los sujetos con normopeso, pero superiores a los de los sujetos obesos. Los sujetos obesos mostraron niveles de adiponectina inferiores a los de los sujetos con normopeso.

Los niveles de insulina y el índice HOMA-IR fueron superiores en los sujetos obesos respecto a los otros dos grupos.

Tabla 1. Características de los sujetos que participaron en el estudio en ayunas

	SPW (n=7)	Obesos (n=16)	Normopeso (n=42)	P
Sexo (H/M)	6/1	10/6	34/8	NS
Edad (años)	24.3±6.7	26.4±4.3	22.4±10.1	NS
IMC (Kg/m²)	41.6±12.3 ^a	40.1±17.2 ^a	20.2±9.3	0.001
Cintura (cm)	109.2±45.3 ^a	111.4±39.6 ^a	67.7±9.2	0.001
Masa grasa (%)	42.7±7.0 ^a	41.6±11.1 ^a	13.7±8.7	0.001
IGF-1 (nmol/l)	11.5±6.2 ^a	19.8±9.5	26.7±4.0	0.039
Glucosa (mmol/l)	5.16±0.64	5.26±0.36	5.03±0.88	NS
Insulina (pmol/l)	57.9±34.6	79.9±27.2 ^{a,c}	31.8±10.7	0.040 ^a 0.048 ^c
Homa-IR	1.84±1.20	3.58±0.98 ^{a,c}	1.72±0.76	0.038 ^a 0.042 ^c
McAuley (índice)	8.73±1.95	6.35±0.19 ^a	11.31±1.73	0.033
Colesterol (mmol/l)	4.52±0.95	4.98±0.65	2.71±0.64	NS
Triglicéridos(mmol/l)	0.87±0.21	0.87±0.41	0.69±0.10	NS
Adiponectina (mg/l)	5.24±2.56 ^b	4.01±1.27 ^{a,c}	8.28±4.63	0.041 ^b 0.036 ^a 0.047 ^c

NOTA: NS=no estadísticamente significativo: ^a, ^b vs. sujetos con normopeso, ^c vs. sujetos con SPW.

Los datos están expresados como media ± desviación estándar . Para comparar los tres grupos se usó un análisis de la varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples posthoc usando la corrección de Bonferroni.

2. Estudio postprandial. Las características de los participantes en el estudio postprandial se muestran en la Tabla 2. En este caso, no se observaron diferencias en los niveles de adiponectina, ni tampoco en los niveles de insulina o el índice HOMA-IR en ayunas.

Tabla 2. Características de los sujetos que participaron en el estudio postprandial

	SPW (n=7)	Obesos (n=7)	Normopeso (n=7)	P
Sexo (H/M)	6/1	6/1	6/1	NS
Edad (años)	24.3±6.7	25.0±4.1	24.1±6.9	NS
IMC (Kg/m²)	41.6±12.3 ^a	41.1±8.3 ^a	21.5±3.0	0.001
Cintura (cm)	109.2±45.3 ^a	108.1±31.0 ^a	79.1±9.2	0.001
Masa grasa (%)	42.7±7.0 ^a	40.4±10.0 ^a	12.3±3.8	0.001
IGF-1 (nmol/l)	11.5±6.2 ^a	17.2±8.0	25.0±6.9	0.043
Glucosa (mmol/l)	5.16±0.64	4.61±0.71	5.13±0.91	NS
Insulina (pool/l)	57.9±34.6	58.9±27.5	38.6±14.9	NS
Homa-IR	1.84±1.20	1.67±0.79	1.22±0.46	NS
McAuley (índice)	8.73±1.95	8.43±0.99	10.41±2.27	NS
Colesterol (mmol/l)	4.52±0.95	4.08±0.88	3.75±0.37	NS
Triglicéridos(mmol/l)	0.87±0.21	0.86±0.27	0.68±0.29	NS
Adiponectina (mg/l)	5.24±2.56	5.99±4.11	6.04±2.28	NS

NOTA: NS= no estadísticamente significativo: ^a vs. sujetos con normopeso.

Los datos están expresados como media ± desviación estándar. Para comparar los tres grupos se usó un análisis de la varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples posthoc usando la corrección de Bonferroni.

2.1. El AUC de las diferentes variables.

El AUC para insulina y triglicéridos fue mayor en los pacientes con SPW y sujetos obesos que en los sujetos con normopeso. El AUC para adiponectina y para glucosa fue igual en los tres grupos (Tabla 3).

Tabla 3. AUC de glucosa, insulina, triglicéridos y adiponectina

AUC (6h)	SPW (n=7)	Obesos (n=7)	Normopeso (n=7)	P
Glucosa (mmol/lxmin)	2057±468	1888±249	1836±234	NS
Insulina (ng/lxmin)	203±86 ^a	276±291 ^b	95±45	0,043 ^a 0,045 ^b
Triglicéridos(mmol/lxmin)	1865±558 ^a	1864±752 ^b	892±689	0,042 ^a 0,041 ^b
Adiponectina (mg/lxmin)	1755±897	2219±1398	2188±738	NS

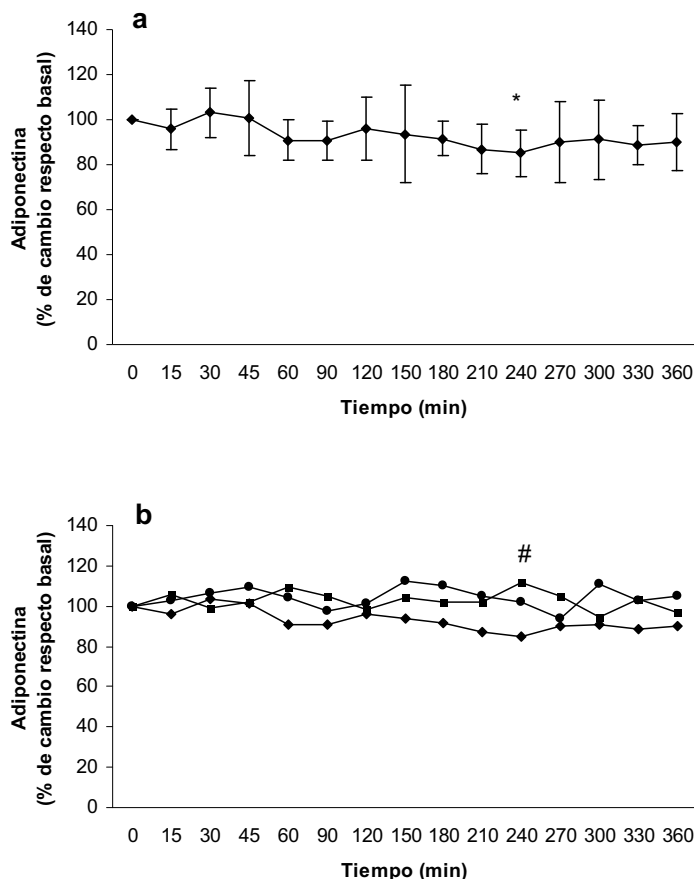
NOTA: NS=no estadísticamente significativo: ^{a,b} vs. sujetos con normopeso. Los datos están expresados como media ± desviación estándar). Para comparar los tres grupos se usó un análisis de la varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples posthoc usando la corrección de Bonferroni.

2.2. Adiponectina postprandial.

No se observó ningún cambio en los niveles de adiponectina tras la ingesta en el grupo de sujetos obesos ni en el grupo de sujetos con normopeso.

En el grupo de pacientes con SPW, se observó un descenso significativo pero de poca relevancia en el minuto 240 (4,52±2,27 µg/ml, P=0,041, representando un descenso respecto al valor basal de 13,8%). Cuando se compararon los tres grupos, la adiponectina fue significativamente inferior en el minuto 240 en el grupo de pacientes con SPW respecto a los otros dos grupos (Figura 1).

Figura 1. Porcentaje de cambio respecto al valor basal de adiponectina plasmática tras la ingesta en pacientes con SPW (a) y en los tres grupos juntos (b).



NOTA: Para el análisis de los datos se utilizó el modelo de análisis general lineal para medidas repetidas con el método de Dunnett: * $p < 0,05$ vs. basal; # $p < 0,05$ pacientes con SPW vs. sujetos obesos y con normopeso.

2.3. Correlaciones. Considerando los tres grupos juntos, las concentraciones de adiponectina en ayunas se correlacionaron negativamente con el IMC ($r = -0,931$, $p = 0,001$), la cintura ($r = -0,698$, $p = 0,004$) y los triglicéridos en ayunas ($r = -0,641$, $p = 0,001$) y positivamente con el índice McAuley ($r = 0,588$, $p = 0,005$). En el análisis de regresión múltiple en el que la adiponectina fue la variable dependiente y las independientes fueron el índice McAuley o el índice HOMA y el IMC, porcentaje de masa grasa y los niveles de

triglicéridos en ayunas, el IMC fue la única variable relacionada con los niveles en ayunas de adiponectina ($r^2=0,131$, $\beta=-0,361$, $p=0,003$).

Las concentraciones postprandiales de adiponectina se correlacionaron negativamente con los triglicéridos, insulina y glucosa postprandiales en diferentes puntos. Cuando se aplicó el análisis de regresión múltiple, la única variable independiente asociada con la adiponectina fueron los niveles de triglicéridos ($r^2=0,362$ $\beta=-0,743$, $p=0,012$, en el minuto 240).

6.3. ESTUDIO 3. Los sujetos adultos con Síndrome de Prader-Willi muestran una mayor inflamación de bajo grado que los sujetos obesos de iguales características antropométricas

La metodología de este estudio fue similar a la de los estudios 1 y 2. En este caso sólo se analizaron las muestras de sangre extraídas a los 7 sujetos de cada grupo que participaron en el estudio postprandial (tiempos 0, 60, 120, 180, 240 y 360 minutos). Se determinaron niveles de testosterona en ayunas y de citocinas inflamatorias en cada muestra de sangre (C3, IL-6, IL-18, TNF- α , PCR)

Resultados principales:

1. Estudio en ayunas.

Los resultados se expresan en la Tabla 1. Los pacientes varones con SPW mostraron niveles de testosterona significativamente inferiores comparado con los sujetos del mismo sexo de los otros dos grupos. Además todos los pacientes con SPW mostraron niveles inferiores de IGF-1.

Los sujetos obesos con o sin SPW mostraron niveles superiores de algunos marcadores de inflamación comparado con el grupo de sujetos con normopeso.

Además, comparado con los sujetos obesos, los pacientes con SPW mostraron niveles superiores de C3, IL-18, IL-6 y PCR, indicando que presentan aún un mayor grado de inflamación.

No se observaron diferencias en los niveles de citocinas entre aquellos pacientes con SPW que habían sido tratados con GH en la infancia y los que no (datos no mostrados).

Tabla 1. Resultados en ayunas de los participantes en el estudio

	SPW (n=7)	Obesos (n=7)	Normopeso (n=7)	P
Sexo (H/M)	6/1	6/1	6/1	NS
Edad (años)	23.0 (20.0-26.0)	26.0 (23.0-27.0)	23.0 (21.0-26.0)	NS
IMC (Kg/m²)	34.5 (33.3-56.5) [£]	43.9 (32.8-48.0) ^P	20.3 (18.9-25.1)	^{£p} 0.001
Cintura (cm)	102.2 (91.0-112.5) [£]	101.3 (92.2-111.1) ^P	70.3 (66.2-81.4)	^{£p} 0.001
Masa grasa (%)	47.0 (33.5-47.7) [£]	42.3 (31.8-44.8) ^P	10.8 (8.80-16.5)	^{£p} 0.001
Glucosa (mmol/l)	4.94 (4.61-5.94)	4.61 (4.33-5.17)	5.05 (4.39-5.72)	NS
Insulina (pmol/l)	43.0 (24.4-79.6)	45.2 (35.2-94.7)	41.6 (20.8-50.2)	NS
Homa-IR	1.45 (0.83-2.56)	1.57 (0.98-2.54)	1.34 (0.88-1.59)	NS
Colesterol (mmol/l)	4.32 (3.02-5.40)	4.00 (3.01-5.60)	3.62 (3.21-4.01)	NS
Triglicéridos (mmol/l)	0.88 (0.73-1.07)	0.91 (0.72-0.97)	0.56 (0.47-1.09))	NS
Testosterona (nmol/l)^r	5.04 (1.41-8.32) ^{£¢}	13.0 (9.17-25.3)	23.1 (19.6-28.9)	[£] 0.009 [¢] 0.035
IGF-1 (nmol/l)	10.3 (7.63-12.3) [£]	15.8 (13.2-17.9)	24.9 (17.2-31.5)	[£] 0.043
C3 (mg/dl)	120.0 (97.4-135.0) ^{£¢}	110.0 (91.2-120.0) ^P	86.4 (79.4-93.1)	[£] 0.007 [¢] 0.018 ^P 0.004
IL-18 (pg/ml)	274.7 (179.7-332.1) ^{£¢}	172.3 (122.5-295.0)	196.1 (144.4-240.9)	[£] 0.044 [¢] 0.048
IL-6 (pg/ml)	2.09 (1.40-3.86) ^{£¢}	1.75 (1.09-2.68) ^P	0.61 (0.56-2.37)	[£] 0.028 [¢] 0.041 ^P 0.048
PCR (mg/l)	14.1 (8.14-26.6) ^{£¢}	3.37 (2.79-9.48)	0.65 (0.36-4.85)	[£] 0.007 [¢] 0.030
TNF (pg/ml)	0.10 (0.08-0.17)	0.13 (0.13-0.16)	0.14 (0.05-0.19)	NS

NOTA:

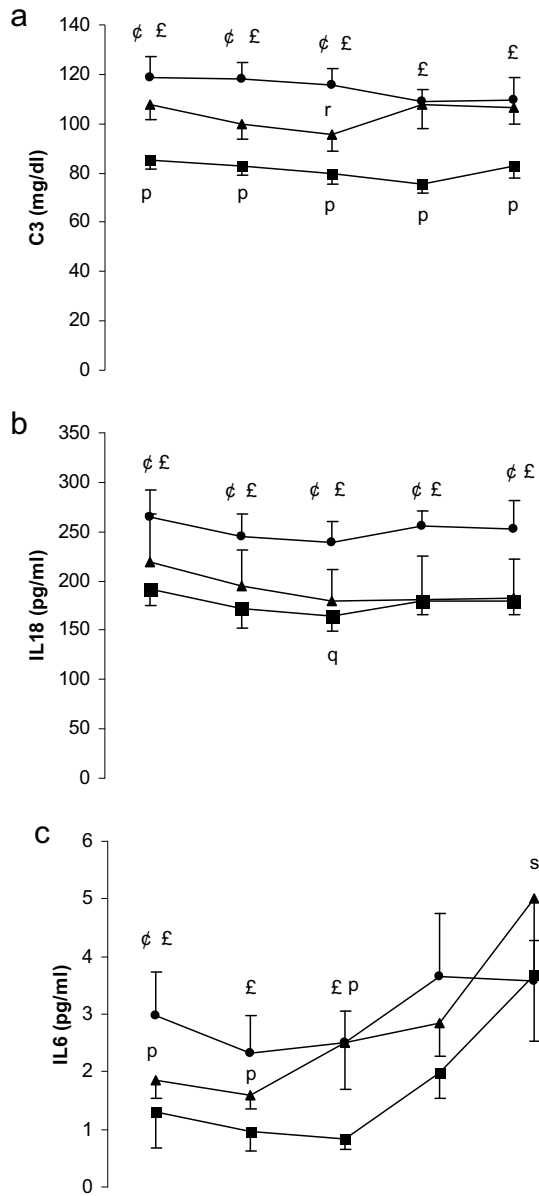
Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil. NS: No estadísticamente significativo,

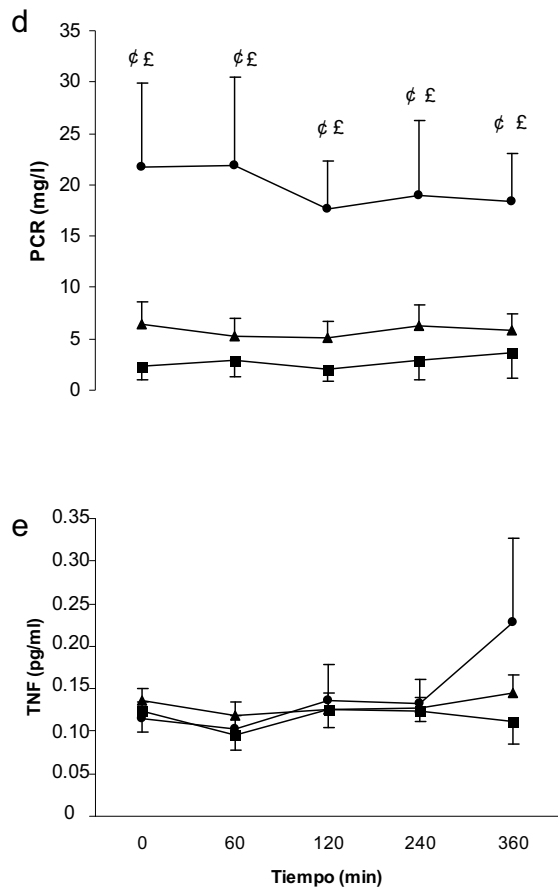
^r Excluidas mujeres, [£] SPW vs. sujetos con normopeso, ^P Obesos vs. sujetos con normopeso, [¢] SPW vs. sujetos obesos.

2. Estudio postprandial:

2.1 Niveles de citocinas: Los resultados se muestran en la figura 1.

Figura 1. Niveles de citocinas en SPW (●), sujetos obesos (▲) y con normopeso (■)





NOTA:

a: ϕ $p < 0.005$ SPW vs. sujetos obesos, ϵ $p < 0.005$ SPW vs. sujetos con normopeso, ρ $p < 0.005$ sujetos obesos vs. sujetos con normopeso, τ $p = 0.0245$ en sujetos obesos tiempo 120' vs. tiempo 0'

b: ϕ $p < 0.05$ SPW vs. sujetos obesos, ϵ $p < 0.05$ SPW vs sujetos con normopeso, ρ $p = 0.0457$ en sujetos con normopeso en tiempo 120' vs. tiempo 0'

c: ϕ $p < 0.05$ SPW vs. sujetos obesos, ϵ $p < 0.05$ SPW vs. sujetos co normopeso, ρ $p < 0.05$ sujetos obesos vs. sujetos con normopeso, σ $p < 0.05$ en sujetos obesos y en sujetos con normopeso en tiempo 360' vs. tiempo 0'

d: ϕ $p < 0.005$ SPW vs. sujetos obesos, ϵ $p < 0.005$ SPW vs sujetos con normopeso

e: No diferencias significativas

2.2. Resultados del AUC de las diferentes variables:

Los resultados del AUC se expresan en la Tabla 2. Con la finalidad de evitar la posible influencia en los resultados de los valores basales de cada una de las variables en el AUC, se calculó además el incremento del AUC (IAUC).

Tabla 2. AUC postprandial (encima) e incremento del AUC (debajo) para las diferentes variables estudiadas.

	SPW (n=7)	Obesos (n=7)	Normopeso (n=7)	P
Glucosa (mol/lxmin)	1.89 (1.67-2.5)	1.76 (1.67-2.18)	1.79 (1.69-2.08)	NS
	0.22 (-0.09-0.38)	0.20 (0.01-0.44)	0.02 (-0.12-0.17)	NS
Insulina (nmol/lxmin)	197.2 (186.6-263.4) [£]	158.5 (127.6-296.9) ^P	93.3 (66.7-116.5)	[£] 0.043 ^P 0.045
	183.7 (142.3-258.2) [£]	124.4 (93.7-285.8) ^P	78.3 (59.2-98.4)	[£] 0.004 ^P 0.044
Triglicéridos(mol/lxmin)	2.14 (1.60-2.18) [£]	1.89 (1.05-2.69) ^P	0.72 (0.49-1.15)	[£] 0.042 ^P 0.041
	1.73 (1.31-1.90) [£]	1.57 (0.90-2.23) ^P	0.50 (0.32-0.75)	[£] 0.035 ^P 0.018
C3 (g/dl x min)	45.0 (34.0-46.7) [£]	35.8 (32.1-42.1) ^P	30.4 (27.0-33.0)	[£] 0.002 ^P 0.026
	-1.11 (-7.92-0.89)	-1.74 (-4.24-(-0.72))	-1.82 (-4.08-1.70)	NS
IL-18 (ng/ml x min)	95.1 (67.6-114.5) [£] [£]	55.4 (49.3-75.5)	60.6 (49.5-78.1)	[£] 0.026 [£] 0.043
	-5.03 (-9.63-(-2.85))	-7.33 (-25.87-5.18)	-5.62 (-9.52-(-5.32))	NS
IL-6 (ng/ml x min)	0.74 (0.64-1.80)	0.97 (0.67-1.95)	0.58 (0.29-1.14)	NS
	0.02 (-0.15-0.26)	0.61 (0.16-1.24)	0.12 (-0.16-0.65)	NS
PCR (g/l x min)	5.95 (3.18-8.64) [£] [£]	1.35 (0.78-3.08)	0.24 (0.18-0.25)	[£] 0.011 [£] 0.010
	-0.03 (-0.93-0.48)	-0.06 (-0.33-0.08)	-0.01 (-0.05-0.29)	NS
TNF (pg/ml x min)	46.2 (33.6-103.4)	52.3 (37.6-57.9)	41.3 (25.5-52.8)	NS
	8.44 (2.81-38.08)	8.71 (-8.11-18.99)	-2.62 (-22.82-18.67)	NS

NOTA: Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil. [£] SPW vs. sujetos con normopeso, ^P sujetos obesos vs con normopeso, [£]SPW vs. sujetos obesos. NS: No diferencias estadísticamente significativas

2.3. Correlaciones: En los sujetos obesos, los niveles de C3 se correlacionaron con el IMC (r=0,877, p=0,026) y con la cintura (r=0,645, p=0,032). En los sujetos con normopeso, los niveles de C3, también se correlacionaron con el IMC (r=0,895, p=0,014) y con la cintura (r=0,777, p=0,023). En los pacientes con SPW no se observó esta relación.

En los pacientes varones con SPW, los niveles de testosterona se correlacionaron con los niveles de IL-18 ($r=-0,646$, $p=0,041$), y mostraron una tendencia a la correlación con los de la PCR ($r=-0,665$, $p=0,05$).

7. DISCUSIÓN CONJUNTA DEL TEMA

Como se ha comentado anteriormente, la obesidad que acompaña al SPW tiene una serie de peculiaridades tanto en lo que se refiere a la distribución de la grasa corporal, como en lo que se refiere a los mecanismos de regulación de la ingesta. Estas características distintivas convierten al SPW en un buen modelo para estudiar cómo se comportan las hormonas que están involucradas en el control del inicio y del final de la ingesta, y también las adipocitocinas que influyen en el balance energético, en la sensibilidad a la insulina y forman parte de la inmunidad innata. Todas estas variables fueron estudiadas tanto en ayunas como tras la ingesta de una comida estándar por dos motivos. El primero, porque debido a su hiperfagia exagerada o a su falta de saciedad, los pacientes con el SPW están durante períodos más prolongados en fase postprandial. El segundo porque se conocía por estudios previos que el comportamiento de la mayoría de ellas estaba influenciado por la ingesta. Además de estudiar pacientes con el SPW, se creyó oportuno comparar los resultados obtenidos con los de un grupo de sujetos obesos y otro de sujetos con normopeso.

Por tanto, en los trabajos publicados que constituyen esta tesis se han estudiado 7 pacientes con SPW (6 hombres y 1 mujer) diagnosticados genéticamente (6 por delección paterna en el 15q11-q13 y un caso con una disomía uniparental materna), 16 sujetos obesos y 42 sujetos sanos con normopeso. De todos ellos, los 7 pacientes con SPW, 7 sujetos obesos y 7 sujetos con normopeso, fueron elegidos para el estudio postprandial. Para evitar sesgos, los individuos obesos con los que se compararon los datos fueron elegidos con especial cuidado, de forma que fueron comparables además de en edad y en sexo, también en IMC, perímetro de la cintura y porcentaje de masa grasa. Los individuos con normopeso eran comparables en edad y sexo.

El hecho de tratarse de una patología poco frecuente junto con el gran esfuerzo que representa para los propios pacientes y familiares la realización de un estudio de 6 horas de duración, dificultaron la obtención de un número más amplio de pacientes. Sin embargo, el tratamiento estadístico de los datos se hizo bajo supervisión de expertos y se aseguraron unas garantías de validez de los datos obtenidos. No obstante, somos conscientes de que existen algunas limitaciones en las conclusiones y de que la extrapolación de los datos de esta muestra a la población general debería hacerse con cautela.

Estudio en ayunas:

De los datos procedentes del conjunto de participantes del estudio en ayunas cabe destacar el mayor grado de resistencia a la insulina medida por el índice HOMA en los sujetos obesos, en comparación con los pacientes con SPW y sujetos con normopeso. Estos resultados concuerdan con los trabajos publicados previamente en los que se describe que los pacientes con SPW son menos resistentes a la insulina que los igualmente obesos sin SPW (16, 19, 135, 137). Otros resultados esperados son los niveles bajos de testosterona en los varones con SPW y los de IGF-1 en ambos sexos, que están en relación al hipogonadismo y al déficit de GH que puede acompañar a este síndrome, respectivamente.

En cuanto a las hormonas involucradas en el control del apetito, los niveles de ghrelina en los pacientes con SPW fueron más elevados que en los otros dos grupos, tal y como ya se había descrito previamente (134, 140-143). En cambio, los niveles de PYY fueron más bajos respecto a los sujetos con normopeso. Este hallazgo concuerda con un estudio realizado en niños con SPW (133), y discrepa de otros dos realizados en

adultos (134, 135). Cuando se compararon los niveles de PYY entre los pacientes obesos con y sin SPW, no se observaron diferencias.

Respecto a los niveles de adiponectina, los pacientes con SPW mostraron niveles intermedios entre los pacientes obesos y los que tenían normopeso. Este resultado está en concordancia con un estudio previo (210), pero no con otro (211) que mostró niveles más altos de adiponectina en el SPW respecto a un grupo control sano. Las diferencias entre los 3 grupos parecen estar más en relación con el peso corporal que con la resistencia a la insulina puesto que en el análisis de regresión múltiple, fué el IMC, y no el índice HOMA, la única variable predictiva de los niveles de adiponectina.

Por último, con respecto a los parámetros inflamatorios, los pacientes con SPW mostraron niveles más elevados de C3, IL6, IL-18 y PCR que los pacientes obesos sin SPW, indicando que en el SPW existe una activación adicional del sistema inmune innato. No se observaron diferencias en los niveles de TNF- α entre los tres grupos. El presente trabajo ha sido el primero en estudiar los niveles de C3, IL-18 y TNF- α en ayunas en el SPW. Con respecto a IL-6 y PCR, los estudios previos existentes muestran resultados dispares. En uno de ellos, los niveles de PCR también fueron superiores en los sujetos obesos con SPW respecto a los sujetos obesos sin SPW (212); en otro (214) los niveles de PCR entre estos dos grupos fueron similares y en un tercer estudio, los niveles de PCR y de IL-6 fueron superiores al rango de normalidad, y disminuían después de ser tratados con GH (215).

Estudio postprandial

En cuanto a la respuesta postprandial de los péptidos involucrados en el control del apetito, cabe destacar que en el presente trabajo se observó una disminución de los niveles de ghrelina tras la ingesta en los tres grupos. Sin embargo, en los pacientes con

SPW este descenso fue menos marcado. De hecho, los niveles de ghrelina empiezan a descender más tarde (a los 60 minutos de iniciada la ingesta) y en menor proporción (nadir del 29% en el minuto 60) respecto a los grupos de sujetos obesos y con normopeso, conllevando que el AUC de ghrelina sea mayor. Dado que los pacientes con SPW están durante períodos más prolongados en fase postprandial, el AUC de ghrelina representa probablemente mejor la ghrelinemia en este grupo de pacientes que los niveles en ayunas. Este resultado está en concordancia con tres estudios previos en niños (142, 144, 216) y otro en adultos (135) con SPW en los que los niveles de ghrelina también disminuyen tras la ingesta, pero no con otro (141) en el que los niveles de ghrelina no se modificaron a los 25 minutos de haber ingerido un alimento líquido. Es posible que la corta duración de este último estudio explique la discrepancia con el resto, puesto que como hemos descrito, el descenso de ghrelina es más tardío en estos pacientes.

Respecto a la respuesta postprandial de la ghrelina en los sujetos obesos, nuestros resultados concuerdan con la mayoría de estudios (72, 105, 216, 217) en los que el descenso de los niveles de ghrelina está presente, y discrepan de los de algunos autores (109, 144) que refieren una falta de respuesta postprandial de este péptido.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la hiperghelinemia observada en los pacientes con SPW. Uno de ellos es el déficit de GH que acompaña a este síndrome. Dado que la ghrelina es un secretagogo endógeno de GH, la GH podría ser un potencial inhibidor de la ghrelina. En nuestro estudio, ninguno de los pacientes estaba bajo tratamiento con GH y los niveles de IGF-1 eran bajos. Sin embargo, no se observó ninguna relación entre los niveles de IGF-1 y los de ghrelina. Por tanto, es poco probable que los niveles de GH fuesen los principales determinantes de una menor supresión de los niveles de ghrelina postprandial. La insulina podría ser otro

potencial factor, ya que algunos estudios (220, 221), aunque no todos (107), han observado un efecto supresor de la insulina sobre la ghrelina. En este estudio, aunque los pacientes con SPW mostraron una relativa hipoinsulinemia en comparación con los sujetos obesos, la respuesta de la insulina tras la ingesta no mostró diferencias respecto a los sujetos obesos, y sin embargo, la supresión de la ghrelina fue inferior. Por tanto, tampoco parece que la insulina sea el único factor que explique esta diferencia en la supresión de la ghrelina. Además, tanto la glucosa en ayunas como la respuesta postprandial y el índice HOMA que podrían influir en los niveles de ghrelina (105, 222-224), no mostraron ninguna correlación con ella. Por lo tanto, otros mecanismos relacionados con la regulación de la ghrelina deben estar involucrados. La leptina tampoco parece que juegue un papel en la regulación de la ingesta en el SPW puesto que como ya se ha comentado anteriormente no se han encontrado alteraciones de sus niveles en estos pacientes (132).

El PYY puede inhibir directamente las neuronas activadas por ghrelina en ratas (225) y disminuir los niveles de ghrelina postprandial en humanos (72), mecanismos que podrían explicar, en parte, su efecto saciante en individuos sanos (71). En el presente estudio, en los pacientes con SPW, los niveles de PYY en ayunas estaban disminuidos, en concordancia con otro estudio previo (133) y presentaron una respuesta postprandial plana a diferencia de otros estudios (134, 135). Por otro lado, a pesar del reducido número de sujetos estudiados, encontramos una correlación negativa entre los niveles de ghrelina y de PYY en ayunas, siendo el nivel de PYY en ayunas el único predictor de la supresión postprandial de la ghrelina. Además, esta correlación negativa entre PYY y ghrelina podría indicar que la respuesta postprandial plana del PYY observada, fuese la responsable de una menor supresión postprandial de la ghrelina. Por tanto, es posible que, el PYY sea en parte responsable de la

hiperghrelinemia observada en el SPW. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito una correlación negativa similar entre PYY y ghrelina en pacientes con bulimia nerviosa (226, 227), en sujetos Afro-Americanos sanos (219) y pacientes en unidades de cuidados intensivos (228).

El mecanismo por el cuál los niveles de PYY tanto basales como su respuesta postprandial están disminuidos en el SPW, no está del todo claro. La resistencia a la insulina, medida por el índice HOMA, no parece que juegue ningún papel relevante puesto que no se ha observado ninguna relación entre este índice y los niveles de PYY (219). Tampoco la acción procinética gástrica que ejerce la ghrelina (229-231), que a la vez inhibe la secreción postprandial de PYY, parece que pueda explicar los niveles bajos de PYY, ya que en el SPW el vaciado gástrico está retrasado a pesar de los niveles de ghrelina elevados (232).

Por otra parte, no se ha demostrado, hasta el momento, ninguna relación entre los genes que codifican el PYY y la ghrelina, y los genes responsables del SPW, ya que los genes que codifican estos péptidos o sus receptores están localizados en cromosomas diferentes y, además, la expresión génica de estos receptores en el cerebro de individuos con y sin SPW es similar (233).

Los sujetos obesos sin SPW y los sujetos con normopeso presentaron unos niveles basales y una respuesta postprandial del PYY similares, de acuerdo con otros trabajos previos (217, 218). Por otro lado, otros estudios habían observado niveles de PYY bajos en ayunas en pacientes obesos (72, 234) o una respuesta postprandial disminuida (72, 217). El hecho de que en nuestro estudio no se hayan observado diferencias entre la respuesta del PYY de los sujetos obesos y con normopeso podría explicarse por el reducido número de individuos estudiados o bien por las diferencias en la composición de la comida mixta administrada respecto a los otros estudios publicados (59).

La adiponectina tras la ingesta no se modificó, ni en los sujetos obesos ni en los sujetos con normopeso, y de forma muy poco marcada disminuyó en los pacientes con SPW, en un solo punto a lo largo de las 6 horas, de forma que el AUC de adiponectina no mostró diferencias entre los tres grupos. Hasta el presente trabajo, no se había estudiado el efecto de la ingesta sobre la adiponectina en pacientes con SPW, pero sí en sujetos obesos o con normopeso. Así, en sujetos con normopeso, la ausencia de cambio de los niveles de adiponectina observada tras la ingesta, ya había sido descrita previamente por otros autores tanto tras una dieta estándar (235-237) como tras una dieta rica en grasas (238) después de 2,5 h (236), 3 h (235) o 6 h postprandiales (238). Los estudios realizados hasta la fecha en sujetos obesos muestran resultados dispares. Así, mientras que uno observó una disminución en los niveles de adiponectina después de dos tipos diferentes de dieta (rica en grasa y rica en carbohidratos pero pobre en fibra) tanto en pacientes diabéticos como en no diabéticos a las 2 y 4 horas tras la ingesta (239), otro estudio no observó ningún cambio después de 60 minutos de un desayuno estándar (240). Los diferentes resultados observados entre estos estudios podrían deberse a la corta duración del período postprandial estudiado, el número limitado de pacientes o el uso de diferentes dietas. Por otro lado, English et al. (235) observaron un aumento postprandial de la adiponectina en 8 de 11 pacientes obesos 3 h después de una dieta estándar. Nuestro estudio no ha reproducido este fenómeno en pacientes aún más obesos, utilizando una dieta similar, durante un período de tiempo postprandial más prolongado y con una mayor frecuencia de extracciones de sangre. Este hecho podría poner en evidencia que tal vez el comportamiento de la adiponectina dependa del grado de obesidad. Con la finalidad de investigar el potencial mecanismo por el cual la adiponectina podría ser modificada después de la ingesta, analizamos la relación entre adiponectina y las concentraciones postprandiales de glucosa, insulina y

triglicéridos. Encontramos una correlación negativa entre glucosa y adiponectina en algunos tiempos postprandiales, sin embargo el AUC de glucosa fue similar en los tres grupos y en cambio, el descenso en la adiponectina sólo se observó en pacientes con SPW. Además, la glucosa fue excluida en el modelo de regresión múltiple paso a paso y, por tanto, no parece que juegue un papel importante en la regulación aguda de la adiponectina.

La insulina a dosis suprafisiológicas disminuye los niveles de adiponectina tanto en animales como en humanos usando un clamp euglucémico hiperinsulinémico (241). Sin embargo, son muchos los estudios que no han encontrado relación entre la adiponectina y los niveles fisiológicos de insulina después de una comida (236, 237, 239). En nuestro caso, el AUC de insulina fue mayor en los pacientes con SPW que en los controles delgados, y fue similar al de los sujetos obesos y, sin embargo, la adiponectina sólo disminuyó en los primeros. Además, la correlación entre insulina y adiponectina fue débil y la insulina fue excluida en el análisis de regresión múltiple. Considerando toda esta información conjuntamente, no parece probable que la insulina actúe como un supresor de la adiponectina en el estado postprandial en pacientes con SPW.

Por otra parte, se ha sugerido que la adiponectina puede estar involucrada en el metabolismo de los lípidos (150). En nuestro estudio, la concentración de triglicéridos correlacionó negativamente con la adiponectina no sólo en tiempo basal, como ya se había publicado previamente (236, 242, 243), sino también durante el estado postprandial. Además, los triglicéridos fueron la única variable relacionada con la adiponectina en el análisis de regresión múltiple paso a paso. Dado que la adiponectina puede estimular la lipólisis (150), nosotros proponemos que hay una interacción entre los niveles de triglicéridos y de adiponectina. Sin embargo, un reciente estudio *in vivo*

no muestra ningún cambio en la adiponectina tras la infusión durante 7 horas de ácidos grasos libres (244). Por lo tanto, no podemos considerar que sean los triglicéridos el principal modulador de la adiponectina en situación postprandial en el SPW.

El discreto descenso de la adiponectina en los pacientes con SPW tras la ingesta, tampoco se puede atribuir a una variación fisiológica diurna como se ha sugerido previamente (237, 245), ya que todas las pruebas se realizaron a la misma hora en los tres grupos. Además, tampoco se observó, en ningún grupo, un pico a última hora de la mañana como se había descrito (236, 237). El déficit de GH tampoco parece influir en los niveles de adiponectina porque no se observó correlación entre IGF-1 y adiponectina en ayunas, y está descrito que el tratamiento sustitutivo con GH en estos pacientes con SPW no modifica los niveles de adiponectina (210).

Por último, evaluamos los cambios de los parámetros inflamatorios tras la ingesta y observamos que en los pacientes con SPW el aumento de inflamación de bajo grado que se observaba en ayunas, persistía en el período postprandial. Las concentraciones de citocinas que ya estaban elevadas tanto en sujetos obesos como con SPW respecto a sujetos con normopeso (C3, IL-6) o elevadas en el grupo con SPW versus sujetos obesos (IL-18, PCR), persistieron también elevadas tras la ingesta. Éste es un hallazgo importante porque una dieta estándar no parece empeorar el nivel de citocinas.

Hemos intentado analizar algunos mecanismos que justifiquen la inflamación adicional que presentan los individuos con SPW. En primer lugar, se ha descrito la presencia de un estado de inflamación de bajo grado en diferentes patologías que cursan con resistencia a la insulina (177, 209, 246-252). No podemos atribuir las diferencias en el estado de inflamación a diferencias en la resistencia a la insulina puesto que los tres grupos presentaron una resistencia a la insulina similar. En segundo lugar, la correlación positiva observada entre IMC y circunferencia de la cintura con C3 en los

sujetos obesos y con normopeso no se observó en los pacientes con SPW y además, los niveles de TNF- α , citocina secretada por el tejido adiposo visceral, fue similar en los tres grupos. Estos hallazgos indican que en el SPW la inflamación no parece estar asociada a la obesidad. Tampoco es sorprendente, dado que como se ha descrito anteriormente, los pacientes con SPW son menos resistentes a la insulina y tienen un perfil metabólico más saludable que otros individuos igualmente obesos. Por lo tanto, las consecuencias metabólicas del incremento de grasa en los pacientes con SPW tendrían menos impacto que en la obesidad común.

Finalmente, postulamos que otros trastornos podrían justificar este mayor estado de inflamación en el SPW. Es conocido que el hipogonadismo se asocia con un cierto estado de inflamación de bajo grado (253). En nuestro estudio, todos los hombres con SPW estaban tratados con dosis bajas de testosterona y mostraban niveles bajos de ésta en la analítica comparados con el resto de participantes; y encontramos una correlación negativa entre IL-18 y testosterona. Por tanto, el déficit de testosterona podría estar en relación con el estado inflamatorio aumentado de los pacientes con SPW. El déficit de GH podría contribuir al grado de inflamación, puesto que se ha relacionado con un aumento de la inflamación tanto en ayunas como tras la ingesta (254-256). No obstante, los pacientes con SPW de nuestro estudio tenían unos niveles de IGF-1 inferiores a los de los sujetos con normopeso, pero similares a los de los sujetos obesos, y no observamos correlación entre el IGF-1 y los marcadores de inflamación. Tampoco encontramos diferencias entre aquellos pacientes con SPW que habían sido tratados con GH durante la infancia y los que no. Sin embargo, el reducido número de casos no nos permite descartar con seguridad que el déficit de GH pueda ser un factor determinante en el grado de inflamación, y para ello sería necesario un estudio específico. Por último, existen otros dos posibles factores tales como la existencia de

trastornos nocturnos de la respiración y el déficit en la activación del sistema parasimpático, situaciones ambas que se dan en los pacientes con SPW y que se han asociado a un aumento de los parámetros de inflamación (214, 257-259). Sin embargo, estos trastornos no fueron estudiados en el presente trabajo y deberían ser objeto de estudios posteriores.

8. CONCLUSIONES FINALES

1. Los pacientes con SPW presentan hiperghrelinemia respecto a los sujetos obesos y a los controles con normopeso.
2. En pacientes con SPW, la disminución de las concentraciones plasmáticas de ghrelina tras la ingesta es menor que en los individuos igualmente obesos y que en los controles con normopeso.
3. En los pacientes con SPW, los niveles plasmáticos de PYY en ayunas están disminuidos y su respuesta postprandial está truncada, respecto a los sujetos obesos y a los controles con normopeso.
4. Nuestros datos sugieren además, que en el SPW existe una correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de PYY y de ghrelina tras la ingesta.
5. Los niveles de adiponectina en ayunas, en los pacientes con SPW son superiores a los de los individuos igualmente obesos, e inferiores a los de los controles sanos con normopeso. Tras la ingesta, los niveles de adiponectina descienden tan sólo y de forma discreta en el grupo con SPW. Por ello, parece poco probable que la adiponectina postprandial juegue un papel en la patogénesis de la obesidad en el SPW.
6. Los pacientes con SPW presentan una mayor inflamación de bajo grado en comparación con los individuos obesos y controles con normopeso. Esta alteración persiste tras la ingesta y es independiente del IMC, la resistencia a la insulina y el déficit de GH.
7. En los hombres con SPW, el déficit de testosterona se relaciona con las concentraciones elevadas de IL-18.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Cassidy SB. Prader-Willi syndrome. *Med Genet* 1997; 34: 917-923.
2. Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. Prader Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993; 91: 398-401.
3. Goldstone AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends in Endocrinol Metab* 2004; 15: 12-20.
4. Laurance BM, Brito A, Wilkinson J. Prader-Willi syndrome after age 15 years. *Arch Dis Child* 1981; 56: 181-186.
5. Brambilla P, Bosio L, Manzoni P, Pietrobelli A, Beccaria L, Chiumello G. Peculiar body composition in patients with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1369-1374.
6. Eiholzer U, Blum WF, Molinari L. Body fat determined by skinfold measurements is elevated despite underweight in infants with Prader-Labhart-Willi syndrome. *J Pediatr* 1999; 134: 222-225.
7. Nardella MT, Sulzbacher SI, Worthington-Roberts BS. Activity levels of persons with Prader-Willi syndrome. *Am J Ment Defic* 1983; 87: 498-505.
8. Burman P, Ritzén EM, Lindgren AC. Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: A review with special reference to GH. *Endocr Rev* 2001; 22: 787-799.
9. van Mil EG, Westerterp KR, Gerver WJ, van Maken L, Kester AD, Saris WH. Body composition in Prader-Willi syndrome compared with nonsyndromal obesity: Relationship to physical activity and growth hormone function. *J Pediatr* 2001; 139: 708-714.

10. Davies PSW, Joughin C. Using stable isotopes to assess reduced physical activity of individuals with Prader-Willi syndrome. *Am J Ment Retard* 1993; 3: 349-353.
11. Coplin SS, Hine J, Gormican A. Outpatient dietary management in the Prader-Willi syndrome. *J Am Diet Assoc* 1976; 68: 330-334.
12. Nelson RA, Anderson LF, Gastineau CF, Hayles AB, Stamnes CL. Physiology and natural history of obesity. *JAMA* 1973; 223: 627-630.
13. van Mil EG, Westerterp KR, Kester AD, Curfs LM, Gerver WJ, Schrandt-Stumpel CT, Saris WH. Activity related energy expenditure in children and adolescents with Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 429-434.
14. van Mil EG, Westerterp KR, Gerver WJ, Curfs LM, Schrandt-Stumpel CT, Kester AD, Saris WH. Energy expenditure at rest and during sleep in children with Prader-Willi syndrome is explained by body composition. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 752-756.
15. Schoeller DA, Levitsky LL, Bandibi LG, Dietz WW, Walckak A. Energy expenditure and body composition in Prader-Willi syndrome. *Metabolism* 1988; 37: 115-120.
16. Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE, Bell JD, Frost G, Saeed N, Hajnal JV, Howard JK, Holland A, Bloom SR. Visceral adipose tissue and metabolic complications of obesity are reduced in Prader-Willi syndrome female adults: Evidence for novel influences on body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4330-4338.
17. Angulo M, Castro-Magana M, Mazur B, Canas JA, Vitollo PM, Sarrantonio M. Growth hormone secretion and effects of growth hormone therapy on growth velocity and weight gain in children with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9: 393-400.

18. Nam SY, Lee EJ, Kim KR, Cha BS, Song YD, Lim SK, Lee HC, Huh KB. Effect of obesity on total and free insulin-like growth factor (IGF)-I, and their relationship to IGF-binding protein (BP)-1, IGFBP-2, IGFBP-3, insulin, and growth hormone. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 355-359.
19. Eiholzer U, Stutz K, Weinmann C, Torresani T, Molinari L, Prader A. Low insulin, IGF-1 and IGFBP-3 levels in children with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 890-893.
20. Swaab DF, Purba JS, Hofman MA. Alterations in the hypothalamic paraventricular nucleus and its oxytocin neurones (putative satiety cells) in Prader-Willi syndrome. A study of five cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 573-579.
21. Swaab D.F. Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Pediatr Suppl* 1997; 423: 50-54.
22. Miller L, Angulo M, Price D, Taneja S. MR of the pituitary in patients with Prader-Willi syndrome: size determinations and imaging findings. *Pediatr Radiol* 1996; 26: 43-47.
23. Schmidt H, Bechtold S, Schwarz HP. Prader-Labhart-Willi syndrome: auxological response to a conventional dose of growth hormone in patients with classical growth hormone deficiency. *Eur J Med Res* 2000; 5: 307-310.
24. Wabitsch M, Heinze E. Body fat in GH-deficient children and the effect of treatment. *Horm Res* 1993; 40: 5-9.
25. Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, Teller W. In-vitro effects of growth hormone in adipose tissue. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 406: 48-53.
26. Eiholzer U, l'Allemand D. Growth hormone normalizes height, prediction of normal height and hand length in children with Prader-Willi syndrome after 4 years of therapy. *Horm Res* 2000; 53: 185-192

- 27.** Eiholzer U, l'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Gasser T, Ellis K. Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long-term effects of growth hormone therapy. *Horm Res* 2000; 53: 200-206.
- 28.** Eiholzer U, Gisin R, Weinmann C, Kriemler S, Steinert H, Torresani T, Zachmann M, Prader A. Treatment with human hormone in patients with Prader-Labhart-Willi syndrome reduces body fat and increases muscle mass and physical performance. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 368-377.
- 29.** Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Allen DB. Growth hormone improves body composition, fat utilization, physical strength and agility, and growth in Prader-Willi syndrome: a controlled study. *J Pediatr* 1999; 134: 215-221.
- 30.** Lindgren AC, Hellström LG, Ritzen EM, Milerad J. Growth hormone treatment increases CO₂-response, ventilation and central respiratory drive in children with Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 936-940.
- 31.** Haqq AM, Stadler DD, Jackson RH, Rosenfeld RG, Purnell JQ, La Franchi SH. Effects of growth hormone on pulmonary function, sleep quality, behaviour, cognition, growth velocity, body composition, and resting energy expenditure in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2206-2212.
- 32.** Craig ME, Cowell CT, Larsson P, Zipf WB, Reiter EO, Wikland A, Ranke MB, Price DA, on behalf of the KIGS International Board. Growth hormone treatment and adverse events in Prader-Willi syndrome: data from KIGS (the Pfizer International Growth Database). *Clin Endocrinol* 2006; 65: 178-185.
- 33.** Höybye C. Endocrine and metabolic aspects of adult Prader-Willi syndrome with special emphasis on the effect of growth hormone treatment. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14: 1-15.
- 34.** Cassidy S. Prader-Willi syndrome. *Curr Probl Pediatr* 1984; 14: 5-55.

35. Zipf WB, Odorisio TM, Cataland S, Dixon K. Pancreatic polypeptide responses to protein meal challenges in obese but otherwise normal children and obese children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 1074-1080.
36. Tomita T, Greeley G, Watt L, Doull V, Chance R. Protein meal-stimulated pancreatic polypeptide secretion in Prader-Willi syndrome of adults. *Pancreas* 1989; 4: 395-400.
37. Schuster DP, Osei K, Zipf WB. Characterization of alterations in glucose and insulin metabolism in Prader-Willi subjects. *Metabolism* 1996; 45: 1514-1520.
38. Muller J. Hypogonadism and endocrine metabolic disorders in Prader-Willi syndrome. *Acta Paediatr* 1997; 86 (Suppl.423): 58-59.
39. Greenswag LR. Adults with Prader-Willi syndrome: a survey of 232 cases. *Dev Med Child Neurol* 1987; 29: 145-152.
40. Crinò A, Schiaffini R, Ciampalini P, Spera S, Beccaria L, Benzi F, Bosio L, Corrias A, Gargantini L, Salvatoni A, Tonini A, Trifirò G, Genetic Obesity Study Group of Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology (SIEDP). Hypogonadism and pubertal development in Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 327-333.
41. Holland AJ, Treasure J, Coskeran P, Dalow J, Milton N, Hillhouse E. Measurement of excessive appetite and metabolic changes in Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; 17: 527-532.
42. Zipf WB, Berntson GG. Characteristics of abnormal food-intake patterns in children with Prader-Willi syndrome and study of effects of naloxone. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 277-281.

43. Fieldstone A, Zifp WB, Sarter MF, Berntson GG. Food intake in Prader-Willi syndrome and controls with obesity after administration of benzodiazepine receptor agonist. *Obes Res* 1998; 6: 29-33.
44. Rankin KM, Mattes RD. Role of food familiarity and taste quality in food preferences of individuals with Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 759-762.
45. Fieldstone A, Zifp WB, Schwartz HC, Berntson GG. Food preferences in Prader-Willi syndrome, normal weight and obese controls. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 1046-1052.
46. Bray GA. *The obese patient*. Philadelphia, Saunders, 1976.
47. Pineda JP, Assanand S, Lehman DR. Hunger, eating and ill health. *Am Psychol* 2000; 55: 1105-1116.
48. Wirtshafter D, Davis JD. Set points, settling points, and the control of body weight. *Physiol Behav* 1977; 19: 75-78.
49. Woods SD, Decke E, Vasselli JR. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* 1974; 81: 26-43.
50. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 2000; 51: 255-277.
51. Keeseey RE, Hirvonen MD. Body weight set-points. Determination and adjustment. *J Nutr* 1997; 127: 1875S-1883S.
52. Hoebel BG, Teitelbaum P. Weight regulation in normal and hypothalamic hyperphagic rats. *J Comp Physiol Psychol* 1966; 61: 189-193.
53. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671.

54. Woods SC, Seeley RJ, Porte DJ, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280:1378-1383.
55. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 2000; 16: 894-902.
56. Small CJ, Bloom SR. Gut hormones and the control of appetite. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 259-263.
57. Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Minireview: gut peptides regulating satiety. *Endocrinology* 2004; 45: 2660-2665.
58. Dhillon WS, Bloom SR. Gastrointestinal hormones and regulation of food intake. *Horm Metab Res* 2004; 36: 846-851.
59. Wynne K, Stanley S, Bloom S. The gut and regulation of body weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2576-2582.
60. Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16: 623-637.
61. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250-252.
62. Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 561-565.
63. Keim NL, Stern JS, Havel PJ. Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 794-801.
64. Larsson H, Elmstahl S, Berglund G, Ahren B. Evidence for leptin regulation of food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4382-4385.

- 65.** Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurts JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-908.
- 66.** Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, Jones S, Gibson WT, Trusell R, Jebb SA, Lip GYH, O'Rahilly S. Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature* 2001; 414: 34-35.
- 67.** Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen N, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 330-331.
- 68.** Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292-295.
- 69.** Hukshorn CJ, van Dielen FM, Buurman WA, Westerterp-Plantenga MS, Campfield LA, Saris WH. The effect of pegylated recombinant human leptin (PEG-OB) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 504-509.
- 70.** Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, Mc Camish M. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *J Am Med Assoc* 1999; 282: 1568-1575.

71. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. Gut hormone PYY₃₋₃₆ physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002; 418: 650-654.
72. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Whitters DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY₃₋₃₆. *N Engl J Med* 2003; 349: 941-948.
73. Track NS, McLeod RS, Mee AV. Human pancreatic polypeptide: studies of fasting and postprandial plasma concentrations. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58: 1484-1489.
74. Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3989-3992.
75. Hazelwood RL. The pancreatic polypeptide (PP-fold) family: gastrointestinal, vascular, and feeding behavioural implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 202: 44-63.
76. Zipf WB, O'Dorisio TM, Cataland S, Sotos J. Blunted pancreatic polypeptide responses in children with obesity of Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 1264-1266.
77. Lieveise RJ, Masclee AA, Jansen JB, Lamers CB. Plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide secretion in response to bombesin, meal ingestion and modified sham feeding in lean and obese persons. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994; 18:123-127.
78. Alderdice JT, Dinsmore WW, Buchanan KD, Adams C. Gastrointestinal hormones in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 1985; 19: 207-213.

- 79.** Uhe AM, Szmukler GI, Collier GR, Hansky J, O'Dea K, Young GP. Potential regulators of feeding behaviour in anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 28-32.
- 80.** Berntson GG, Zipf WB, O'Dorisio TM, Hoffman JA, Chance RE. Pancreatic polypeptide infusions reduce food intake in Prader-Willi syndrome. *Peptides* 1993; 14: 497-503.
- 81.** Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP, Naslund E, Beglinger C, Hellstrom PM, Long SJ, Morgan LM, Holst JJ, Astrup A. A meta-analysis of the effect of glucagons-like peptide 1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4382-4389.
- 82.** Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgard MJ, Juul HJ, Astrup A. The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety-effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1206-1214.
- 83.** Naslund E, King N, Mansten S, Adner N, Holst JJ, Gutniak M, Hellstrom PM. Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *Br J Nutr* 2004; 91: 439-446.
- 84.** Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4696-4701.
- 85.** Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Wilms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagons-like peptide-1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993; 36: 741-744.
- 86.** Moran TH, Schwartz GJ. Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev Neurobiol* 1994; 9: 1-28.

- 87.** Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae H, Andresen V, van der Voort IR, Veh RW, Werner CR, Klapp BF, Wiedenmann B, Wang L, Tache Y, Monnikes H. CKK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R751-758.
- 88.** Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1973; 84: 488-495.
- 89.** Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
- 90.** Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal M, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141:4255-4261.
- 91.** Gualillo O, Caminos E, Blancos M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142: 788-794.
- 92.** Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000; 486: 213-216.
- 93.** Korbonits M, Kojima M, Grossman A. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 2001; 14: 101-104.
- 94.** Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1300-1308.

- 95.** Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln¹⁴-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 21995-22000.
- 96.** Bowers C. Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86: 1464-1469.
- 97.** Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 909-913.
- 98.** Muccioli G, Tschöp M, Papotti M, Denghenghi R, Herman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 2002; 40: 235-254.
- 99.** Howard A, Feighner S, Cully D, Arena J, Liberators P, Rosenblum C, Hamelin M, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 975-977.
- 100.** Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Grazziani A, Deghenghi R, Reissman T, Ghigo E, Muccioli G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1738-1745.
- 101.** Korbonits M, Bustin S, Kojima M, Jordan S, Adams E, Lowe D, Kangawa K, Grossman AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 881-887.

- 102.** Tschöp M, Wawarta R, Riepl R, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: RC19-21.
- 103.** Tschöp M, Weyer C, Tataranni A, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman M. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-709.
- 104.** Cummings D, Weigle D, Frayo S, Breen P, Ma M, Dellinger E, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346: 1623-1632.
- 105.** Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal M, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 240-244.
- 106.** Dall R, Kanaley J, Hansen TK, Moller N, Christiansen JS, Hosoda H, Kangawa K, Jorgensen JO. Plasma ghrelin levels during exercise in healthy subjects and in growth hormone-deficient patients. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 65-70.
- 107.** Caixàs A, Bashore C, Nash W, FX. Pi-Sunyer, Lafarrère B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1902-1906.
- 108.** Cummings D, Purnell J, Frayo R, Schmidova K, Wisse B, Weigle D. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1-6.
- 109.** English PJ, Ghatti MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JPH. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2984-2987.

- 110.** Hansen T, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Chistiansen J, Jorgensen JO. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol* 2002; 56: 203-206.
- 111.** Frühbeck G, Díez-Caballero A, Gil M J, Montero I, Gómez-Ambrosi J, Salvador J, Cienfuegos JA. The decrease in plasma ghrelin concentrations following bariatric surgery depends on the functional integrity of the fundus. *Obes Surg* 2004; 14: 606-612.
- 112.** Cummings DE, Coupaye M, Frayo RS, Guy-Grand B, Basdevant A, Clement K. Weight loss caused by adjustable gastric banding increases plasma ghrelin levels in humans. 85th Annual Meeting of The Endocrine Society, Philadelphia, PA, 2003, Abstract OR33-3.
- 113.** Hanusch-Enserer U, Brabant G, Roden M. Ghrelin concentrations in morbidly obese patients after adjustable gastric banding. *N Engl J Med* 2003; 348: 2159-2160.
- 114.** Geloneze B, Tambascia MA, Pilla VF, Geloneze SR, Repetto EM, Pareja JC. Ghrelin: a gut-brain hormone: effect of gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2003; 13:17-22.
- 115.** Tritos NA, Mun E, Bertkau A, Grayson R, Maratos-Flier E, Goldfine A. Serum ghrelin levels in response to glucose load in obese subjects post-gastric bypass surgery. *Obes Res* 2003; 11:919-924
- 116.** Holdstock C, Engström B, Öhrvall M, Lind L, Sundbom M, Karlsson F.A. Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric by-pass surgery in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3177-3183.
- 117.** Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight

loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1594-1602.

118. Tschöp M, Statnick M, Suter T, Heiman M. GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. *Endocrinology* 2002; 143:558-568.

119. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda S, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758.

120. Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: R1-3.

121. Nagaya N, Vematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationship between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104: 2034-2038.

122. Wise BE, Frayo RS, Schwartz MW, Cummings DE. Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats. *Endocrinology* 2001; 142: 3292-32301.

123. Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang P, Epelbaum J, Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 109-116.

- 124.** Nedvídková J, Krykorková I, Barták V, Papezová H, Gold P, Alesci S, Pacak K. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 1678-1682.
- 125.** Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschöp M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 669-673.
- 126.** Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatric Res* 2003; 37: 17-22.
- 127.** Barkan A, Dimaraki E, Jessup S, Symons K, Ermolenko M, Jaffe C. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2180-2184.
- 128.** Goldstone AP, Unmehopa UA, Bloom SR, Swaab DF. Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 927-937.
- 129.** Goldstone AP, Unmehopa UA, Thomas EL, Brynes AE, Bell JD, Frost G, Ghatei MA, Holland A, Bloom SR, Saab DF. Hypothalamic neuropeptides and regulation of fat mass in Prader-Willi syndrome. En: Eiholzer U., L'Allemand D., Zipf WB., editors. *Prader-Willi syndrome as a model for obesity*. Zurich: Karger; 2002.p.31-43.
- 130.** Ebert MH, Schmidt DE, Thompson T, Butler MG. Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in individuals with either Prader-Willi syndrome or Angelman syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1997; 9: 75-80.

- 131.** Wagstaff J, Knoll JH, Fleming J, Kirkness EF, Martin-Gallardo A, Greenberg F, Graham JM, Menninger J, Ward D, Venter JC, Lalande M. Localization of gene encoding the GABA-A receptor beta-3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 330-337.
- 132.** Goldstone AP, Brynes AE, Thomas EL, Bell JD, Frost G, Holland A, Ghattei MA, Blom SR. Resting metabolic rate, plasma leptin concentrations, leptin receptor expression, and adipose tissue measured by whole-body magnetic resonance imaging in women with Prader-Willi syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 468-475.
- 133.** Butler MG, Bittel CD, Talebizadeh Z. Plasma peptide YY and ghrelin levels in infants and children with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 17: 1177-1184.
- 134.** Tan TM, Vanderpump M, Khoo B, Patterson M, Ghattei MA, Goldstone AP. Somatostatin infusion lowers plasma ghrelin without reducing appetite in adults with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4162-4165.
- 135.** Goldstone AP, Patterson M, Kalingag N, Ghattei MA, Brynes AE, Bloom SR, Grossman AB, Korbonits M. Fasting and post-prandial hyperghrelinemia in Prader-Willi syndrome is partially explained by hypoinsulinemia, and is not due to PYY deficiency or seen in hypothalamic obesity due to craniopharingioma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2681-2690.
- 136.** Zipf WB, O'Dorisio TM, Berntson GG. Short-term infusion of pancreatic polypeptide: effect on children with Prader-Willi syndrome. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 162-166.
- 137.** Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE, Castroman G, Edwards R, Ghattei MA, Frost G, Holland AJ, Grossman AB, Korbonits M, Bloom SR, Bell JD. Elevated fasting plasma ghrelin in Prader-Willi syndrome adults is not solely explained by their

reduced visceral adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1718-1726.

138. Smith GP, Gibbs J. Satiating effect of cholecystokinin. *Ann NY Acad Sci* 1994; 713: 236-241.

139. Butler MG, Carlson MG, Schmidt DE, Feurer ID, Thompson T. Plasma cholecystokinin levels in Prader-Willi syndrome and obese subjects. *Am J Med Genet* 2000; 95:67-70.

140. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi syndrome. *Nat Med* 2002; 8: 643-644.

141. Delparigi A, Tschop M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, Bunt JC, Tataranni A. High circulating ghrelin: a potential cause for the hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5461-5464.

142. Haqq AM, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Weigle DS, Frayo RS, LaFranchi SH, Cummings DE, Purnell JQ. Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octeotide therapy in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3573-3576.

143. Höybye C, Barkeling B, Espelund U, Petersson M, Thorén M. Peptides associated with hyperphagia in adults with Prader-Willi syndrome before and during GH treatment. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13: 322-327.

144. Bizzarri C, Rigamonti AE, Giannone G, Berardinelli R, Cella SG, Cappa M, Müller EE. Maintenance of a normal meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in children with Prader-Willi syndrome. *Horm Metab Res* 2004; 3: 164-169.

145. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144: 3765-3773.

- 146.** Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn CR. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 2002; 3: 25-38.
- 147.** Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron J-C, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction and aging affect the adipocyte-specific secretory protein Acrp30/adiponectin. *Diabetes* 2003; 52:268-276.
- 148.** Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serumprotein similar to Cq1, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746-26749.
- 149.** Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin: implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2002; 278: 9073-9085.
- 150.** Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-KDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:2005-2010.
- 151.** Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Mada K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of and adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83.

- 152.** Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao L, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3815-3819.
- 153.** Havel PJ. Update on adipocyte hormones. Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53: S143-S151.
- 154.** Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulation protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 51-59
- 155.** Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin: its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 2002; 34: 469-474.
- 156.** Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 1999; 38: 202-206.
- 157.** Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892: 146-154.
- 158.** Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res* 2000; 32:47-50.
- 159.** Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001; 103: 1057-1063.

- 160.** Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002; 277: 25863-25866.
- 161.** Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002; 106: 2767-2770.
- 162.** Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimosawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi H, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 2461-2468.
- 163.** Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003; 46: 459-469.
- 164.** Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Maerker E, Haring H, Stumvoll M. Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 2003; 52: 239-243.
- 165.** Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930-1935.

- 166.** Matsubara M, Katayose S, Maruoka S. Decreased plasma adiponectin concentrations in nondiabetic women with elevated homeostasis model assessment ratios. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 343-350.
- 167.** Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7: 947-953.
- 168.** Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108: 1875-1881.
- 169.** Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Teuchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7: 941-946.
- 170.** Moller DE. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 212-217.
- 171.** Fried SK, Bunkin DA, Greenberg. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847-850.
- 172.** Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95: 2111-2119.
- 173.** Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 1994; 94: 1543-1549.

- 174.** Bruun JM, Lihn AS, Vedich C, Pedersen SB, Toubro S, Asrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E527-E533.
- 175.** Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 447-452.
- 176.** Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Borgadus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001; 9: 414-417.
- 177.** Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E745-E751.
- 178.** Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334.
- 179.** Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 85:3338-3342.
- 180.** Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2001; 88: 10K-15K.
- 181.** Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum in subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3338-3342.
- 182.** Vozarova B, Fernandez-Real JM, Kowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-

174)G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112: 409-413.

183. Schultz Dr Arnold PI. Properties of four acute phases proteins: CRP, serum amyloid A protein, acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 20: 129-147.

184. Osmand AP, Friedeson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E. Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1q as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Nat Acad Sci USA* 1977; 74:739-743.

185. Tietz NW editor. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 358.

186. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-979.

187. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-843.

188. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of evidence. *JAMA* 2003; 290: 932-940.

189. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350: 1387-1397.

190. Visser M, Bouter LM, Mc Quillan GM, Wenwe MH, et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282: 2131-2135.

- 191.** Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105: 564-569.
- 192.** Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002; 105: 804-809.
- 193.** Mac Gregor AJ, Gallimore JR, Spector TO, Pepys MB. Genetics effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid A protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem* 2004; 50: 130-134.
- 194.** Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M, Liu K, Williams OD, Iribarren C, Lewis EC, Fornage M, Boerwinkle E, Gross M, Jaquish C, Nickerson DA, Myers RM, Siscovick DS, Reiner AP. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 64-77.
- 195.** Morikis D, Lambris JD. Structural aspects and design of low-molecular-mass complement inhibitors. *Biochem Soc Trans* 2001; 30: 1026-1036.
- 196.** Sahu A, Lambris JD. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. *Immunopharmacology* 2000; 49: 133-148.
- 197.** Atkinson J, Fairies T. Separations of self from non-self in the complement system. *Immunol Today* 1987; 8: 212-215.
- 198.** Nilson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol* 2007; 44: 82-94.

- 199.** Engström G, Hedblad B, Janzon L, Lindgärde F. Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14: 392-397.
- 200.** Muscari A, Bozzoli C, Puddu GM, Sangiorgi Z, Dorni A, Rovinetti C, Descovich GC, Puddu P. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am J Med* 1995; 98: 357-364.
- 201.** Engström G, Hedblad B, Berglund G, Janzon L, Lindgärde F. Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 276-282.
- 202.** Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukuda Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88-91.
- 203.** Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konoshi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia Coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156: 4274-4279.
- 204.** Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998; 70: 281-312.
- 205.** Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient polipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res* 2003; 59:234-240.

- 206.** Esposito K, Pontillo A, Ciotola M, Di Palo C, Grella E, Nicoletti G, Giugliano D. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3864-3866.
- 207.** Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ, AtheroGene Investigators. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation* 2002; 106: 24-30.
- 208.** Hulthe J, McPheat W, Samnegard A, Tornvall P, Hamsten A, Eriksson P. Plasma interleukin (IL)-18 concentrations is elevated in patients with previous myocardial infarction and related to severity of coronary atherosclerosis independently of C-reactive protein and IL-6. *Atherosclerosis* 2006; 188: 450-454.
- 209.** Escobar-Morreale H, Botella-Carretero JJ, Villuendas G, Sancho J, San Millán JL. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 806-811.
- 210.** Höybye C, Bruun JM, Richelsen B, Flyvbjerg A, Frystyk J. Serum adiponectin levels in adults with Prader-Willi syndrome are independent of anthropometrical parameters and do not change with GH treatment. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 457-461.
- 211.** Festen DA, van Toorenbergen A, Duivenvoorden HJ, Hokken-Koelega ACS. Adiponectin levels in prepubertal children with Prader-Willi syndrome before and during growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1549-1554.
- 212.** Butler MG, Bittel DC, Kibiryeveva N, Garg U. C-reactive protein levels in subjects with Prader-Willi syndrome and obesity. *Genet Med* 2006; 8: 243-248.
- 213.** Patel S, Harmer J, Loughnan G, Skilton M, Steinberck K, Celermajer DS. Characteristics of cardiac and vascular structure and function in Prader-Willi syndrome. *Clin Endocrinol* 2007; 66: 771-777.

- 214.** Marzullo P, Marcassa C, Campini R, Eleuteri E, Minocci A, Priano L, Temporelli P, Sartorio A, Vettor R, Liuzzi A, Gruqni G. The impact of growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and nocturnal breathing disorders on cardiovascular features of adult patients with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5639-5646.
- 215.** Höybye C. Inflammatory markers in adults with Prader-Willi syndrome before and during 12 months growth hormone treatment. *Horm Res* 2006; 66: 27-32.
- 216.** Paik KH, Choe YH, Park WH, Oh YJ, Kim AH, Chu SH, Kim SW, Kwon EK, Han SJ, Shon WY, Jin DK. Suppression of acylated ghrelin during oral glucose tolerance test is correlated with whole body insulin sensitivity in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1876-1881.
- 217.** Stock S, Leichner P, Wong A, Ghatei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, Chanoine JP. Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2161-2168.
- 218.** Kim B, Carlson OD, Jang H, Elahi D, Berry C, Egan JM. Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6665-6671.
- 219.** Bacha F, Arslanian SA. Ghrelin and peptide YY in youth: are there race-related differences? *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91; 3117-3122.
- 220.** Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E313-E316.

- 221.** Saad MF, Bernaba B, Hwu C, Jinagouda S, Fahmi S, Kosogov E, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3997-4000.
- 222.** Mc Laughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistance obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1630-1635.
- 223.** Ikekazi A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, Kondo C, Kojima M, Kangawa K, Sugihara S. Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* 2002; 51: 3408-3411.
- 224.** Gottero C, Bellone S, Rapa A, van Koetsveid P, Vivenza D, Prodam F, Benso A, Destefanis S, Gauna C, Bellone J, Hofland L, van der Lely AJ, Bona G, Ghigo E, Broglio F. Standard light breakfast inhibits circulating ghrelin level to the same extent of oral glucose load in humans, despite different impact on glucose and insulin levels. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 1203-1207.
- 225.** Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA. Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 317-326.
- 226.** Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, Nakazato M, Naruo T. Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 74-78.
- 227.** Monteleone P, Martiadis V, Rigamonti AE, Fabrazzo M, Giordani C, Muller EE, Maj M. Investigation of peptide YY and ghrelin responses to a test meal in bulimia nervosa. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 926-931.

- 228.** Nematy M, O'flynn JE, Wandrag L, Brynes AE, Brett SJ, Patterson M, Ghati MA, Bloom SR, Frost GS. Changes in appetite related gut hormones in intensive care units patients: a pilot cohort study. *Crit Care* 2005; 10: R10.
- 229.** Yakabi K, Ro S, Onouhi T, Tanaka T, Ohno S, Mira S, John Y, Takayama K. Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1313-1321.
- 230.** Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoortere C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 2006; 55: 327-333.
- 231.** Levin F, Edholm T, Schmidt PT, Gryback P, Jacobsson H, Degerblad M, Hoybye C, Holst JJ, Rehfeld JF, Hellstrom PM, Naslund E. Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal weight humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3296-3302.
- 232.** Choe YH, Jin DK, Kim SE, Song SY, Paik KH, Park HY, Oh YJ, Kim AH, Kim CW, Chu SH, Kwon EK, Lee KH. Hyperghrelinemia does not accelerate gastric emptying in Prader-Willi syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3367-3370.
- 233.** Talebizadeh Z, Kibiryebe N, Bittel DC, Butler MG. Ghrelin, peptide YY and their receptors: Gene expression in brain from subjects with and without Prader-Willi syndrome. *Int J Mol Med* 2005; 15: 707-711.
- 234.** Roth CL, Enriori PJ, Harz K, Woelfle J, Cowley MA, Reinehr T. (2005) Peptide YY is a regulator of energy homeostasis in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6386-6391.
- 235.** English PJ, Coughlin SR, Hayden K, Malik IA, Wilding JPH. Plasma adiponectin increases postprandially in obese, but not in lean subjects. *Obes Res* 2003; 11:839-844.

- 236.** Hota K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muaguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595-1599.
- 237.** Gravila A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros C. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2838-2848.
- 238.** Peake PW, Kriketos AD, Denyer GS, Campbell LV, Charlesworth JA. The postprandial response of adiponectin to a high-fat meal in normal and insulin-resistant subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 657-662.
- 239.** Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, Paolisso G, Giugliano D. Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 1135-1140.
- 240.** Imbeault P, Pomerleau M, Haper ME, Doucet E. Unchanged fasting and postprandial adiponectin levels following a 4-day caloric restriction in young healthy men. *Clin Endocrinol* 2004; 60: 429-433.
- 241.** Möhling M, Wegewitz U, Osterhoff M, Isken F, Ristow M, Pfeiffer AF, Spranger J. Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm Metab Res* 2002; 34: 655-658.
- 242.** Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2395-2398.

- 243.** Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:134-141.
- 244.** Staiger H, Tschritter O, Kausch C, Lammers R, Stumvoll M, Haring HU. Human serum adiponectin levels are not under short-term negative control by free fatty acids in vivo. *Horm Metab Res* 2002; 34: 601-603.
- 245.** Calvani M, Scarfone A, Granato L, Mora EV, Nani G, Castegnato M, Greco AV, Manco M, Mingrone G. Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2004; 53: 939-947.
- 246.** Van Oostrom AJ, van Wijk JPH, Castro-Cabezas M. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: Novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs* 2004, 64 (suppl 2):19-41.
- 247.** Fischer CP, Perstrup LB, Berntsen A, Eskild P, Pedersen BK. Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clin Immunol* 2005, 117: 152-160.
- 248.** Meijssen S, van Dijk H, Verseyden C, Erkelens M, Castro Cabezas M. Delayed and exaggerated postprandial complement component 3 response in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 811-816.
- 249.** Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, Simón I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004, 12: 962-971.
- 250.** Maachi M, Piéroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose

tissue TNF-alpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28: 993-937.

251. Lopez-Bermejo A, Bosch M, Recasens M, Biarnés J, Esteve E, Casamitjana R, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real JM. Potential role of interleukin-18 in liver disease associated with insulin resistance. *Obes Res* 2005, 13: 1925-1931.

252. Hung J, McQuillan BM, Chapman CM, Thompson PL, Beilby JP. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25: 1268-1273.

253. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyssönen K, Tuomainen TP, Salonen R, Rauramaa R, Salonen JT. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol* 2003, 149: 601-608.

254. Heald AH, Anderson SG, Ivison F, Laing I, Gibson JM, Cruickshank K. C-reactive protein and the insulin-like growth factor (IGF)-system in relation to risk of cardiovascular disease in different ethnic groups. *Atherosclerosis* 2003, 170: 79-86.

255. Kaushal K, Heald AH, Siddals K, Sanhu MS, Dunger DB, Gibson JM, Wareham NJ. The impact of abnormalities in IGF and inflammatory systems on the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2004, 27: 2682-2688.

256. Twickler TB, Dallinga-Thie GM, Visseren LJ, de Vries WR, Erkelens DW, Koppeschaar HPF. Induction of postprandial inflammatory response in adult onset growth hormone deficiency is related to plasma remnant-like particle-cholesterol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 1228-1233.

257. Chorostowska-Wynimko J, Radomska D, Plywaczewski D, Jonczak L, Stepniewska A, Gorecka D, Skopinska-Rózewska E. Disturbed angiogenic activity in sera from obstructive sleep apnea patients. *J Physiol Pharmacol* 2005, 56 (Suppl 4):71-77.

- 258.** Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, Okada S, Ohta S, Naito H, Adachi M. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172: 625-630.
- 259.** Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Stuiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Savewein HP, Buijs RM. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat: functional implications. *J Clin Invest* 2002, 110: 1243-50.

10. ARTÍCULOS ORIGINALES DE LA TESIS DOCTORAL

10.1. ARTÍCULO 1: “La menor supresión de los niveles postprandiales de ghrelina en el Síndrome de Prader-Willi se asocia a unos niveles de péptido YY en ayunas disminuidos y a una respuesta postprandial truncada”

ORIGINAL ARTICLE

A lesser postprandial suppression of plasma ghrelin in Prader–Willi syndrome is associated with low fasting and a blunted postprandial PYY response

Olga Giménez-Palop*, Gabriel Giménez-Pérez*, Dídac Mauricio*, José-Miguel González-Clemente*, Neus Potaut†, Eugenio Berlanga‡, Roser Trallero*, Blandine Laferrère§ and Assumpta Caixàs*

*Unit of Diabetes Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Sabadell, Spain, †Hormone Laboratory, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, UAB, Barcelona, Spain, ‡Hormone Laboratory, UDIAT, Sabadell, Spain, and §New York Obesity Research Center, St Luke's-Roosevelt Hospital, Columbia University, New York, USA

Summary

Objective Ghrelin and polipeptide YY (PYY) are involved in the regulation of food intake. We evaluated these two peptides and their possible relationship in adult patients with Prader–Willi syndrome (PWS).

Patients Seven patients with PWS, 16 age-sex-BMI matched obese and 42 age-sex matched lean subjects.

Design and measurements Fasting plasma PYY and ghrelin levels were measured in all subjects and, postprandially until 6 h, in seven matched subjects of each group.

Results Fasting ghrelin levels were higher in PWS than in the other two groups. Fasting PYY levels were lower in patients with PWS than in lean subjects but similar to those in obese subjects. The postprandial decrease in ghrelin concentrations was lower in PWS as compared to the other two groups and therefore the 6-h-postprandial area under the curve (AUC) for ghrelin was higher in PWS than in obese subjects. PYY response after the meal was blunted in patients with PWS, but not in the other two groups that showed a peak at 60 min. The AUC for PYY was lower in PWS as compared to the other two groups. Fasting PYY levels correlated negatively with fasting ghrelin levels and with ghrelin AUC and they were the only predictor for ghrelin AUC ($\beta = -0.464$, $P = 0.034$). The increase in PYY correlated negatively with the decrease in ghrelin at times 60 min and 120 min in PWS.

Conclusions In PWS, the low decrease in postprandial ghrelin levels could be related to the low fasting PYY concentrations and their blunted postprandial response.

(Received 10 July 2006; returned for revision 13 August 2006; finally revised 24 August 2006; accepted 28 August 2006)

Introduction

Prader–Willi syndrome (PWS) is considered as one of the most common causes of genetic obesity in humans and occurs in about one in 10 000–20 000 live births.¹ It is due to the absence or lack of expression of the paternally inherited genetic material located in the region 15q11, q13.² The characteristic clinical features include neonatal hypotony, mental retardation, behavioural abnormalities and excessive appetite with progressive massive obesity.³ Morbid obesity and its complications are a major cause of morbidity and mortality in these patients.⁴ They may also have endocrinological disorders such as growth hormone (GH) deficiency and hypogonadotropic hypogonadism, as a result of hypothalamic-pituitary dysfunction.⁵

Regulation of food intake is a complex process involving both mechanical and hormonal signs from the gastrointestinal tract that are integrated in the hypothalamic areas of feeding regulation.^{6–9}

Ghrelin, an orexigenic hormone mainly secreted by the stomach,^{10–12} may play a role in meal initiation.¹² In healthy subjects, ghrelin levels increased in fasting states and immediately before meals and decreased after a meal ingestion.^{14–16}

PYY is an anorexigenic intestinal peptide that shares homology with pancreatic polypeptide and neuropeptide Y and is released postprandially in proportion to the caloric content of a meal.¹⁷ Although the effect of PYY on food intake is conflicting in animal studies,¹⁸ in humans, an acute physiological infusion of PYY (resulting in normal postprandial serum PYY concentrations) significantly reduced appetite and food intake in lean and obese subjects.¹⁹

Recently, some studies have tried to evaluate the potential role of ghrelin and PYY in the hyperphagia of patients with PWS. High fasting ghrelin levels have been suggested to contribute to the absence of satiety in patients with PWS.^{20–24} Four studies (three in children^{22,25,26} and one in adults²⁷) reported a postprandial fall of ghrelin levels in PWS, while another study in adult patients reported a lack of postprandial suppression measured only at one time point.²¹ There are three conflicting studies with PYY in PWS. The first one showed lower fasting PYY in children with PWS as compared to a control population of newborn and infants from a different study.²⁸ The other two studies in adult patients with PWS reported

Correspondence: Dr Assumpta Caixàs, Unit of Diabetes Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell c/Taulí s/n 08208 Sabadell, Spain. Tel.: +34 937458412; Fax: +34 937160646; E-mail: acaixas@cspt.es

normal fasting and postprandial PYY levels after different calorie standard meals^{24,27} and a lack of relationship between ghrelin and PYY levels.²⁷

However, in non-PWS subjects,¹⁹ PYY can acutely reduce fasting and postprandial ghrelin levels, an effect that may potentiate satiety. We hypothesized that PWS patients might have a lack of PYY that prevented the decrease of ghrelin after the meal and both could contribute to the lack of satiety. Therefore we conducted this study in order to evaluate the changes in plasma ghrelin and PYY during and up to 360 min after a standard liquid meal and their possible relationship. Results were compared between patients with PWS, matched obese individuals and lean controls.

Subjects and methods

Subjects

Seven adult patients, 6 male and 1 female, with genetically diagnosed PWS (6 paternal deletion in 15q11–q13 and one maternal uniparental disomy of chromosome 15), 16 obese non-PWS patients and 42 lean subjects were studied. Of the total, 7 subjects with PWS, 7 age-sex-BMI matched obese patients and 7 age-sex matched lean subjects were chosen for the postprandial study.

Patients were recruited from the Endocrinology Clinic and informed consent was obtained from them (obese subjects) or their parents (PWS patients) prior to starting the study. The matched lean controls were hospital staff who also gave informed consent. All subjects were Caucasian and their weight had been stable for at least 3 months before inclusion in the study. All males with PWS were under testosterone replacement for hypogonadism and three had GH deficiency in childhood and had been treated until puberty. The protocol was approved by the Institutional Ethics Committee and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Methods

Subjects were admitted to the Unit at 8:00 a.m. after an overnight fast of at least 10 h. For the postprandial study, subjects remained seated and no physical exercise was allowed until the end of the testing sessions.

After bladder evacuation, anthropometrical parameters were determined by bioelectrical impedance analysis (TANITA, body composition analyser TBF-300, Tanita Corporation, Tokyo, Japan). A catheter was then inserted into the antecubital vein and the line was kept with saline infusion. Blood samples were drawn before and after a standard liquid meal (750 kCal: 55% carbohydrate, 30% fat, 15% protein; Ensure HN[®], Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) every 15 min for the first hour and every 30 min thereafter. Previous data, using this meal, showed good insulin and glucose response in lean subjects¹⁶ and in PWS and obese patients.²⁹

All samples were collected on ice and spun at 4 °C. Plasma (EDTA (for assay of ghrelin) and lithium heparin containing aprotinin (for assay of PYY)) or serum (for assay of insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I)) were separated and kept at –80 °C until processed.

All samples were assayed in duplicate. Total PYY was determined according to Linco Research procedure (St Charles, MO, USA). The

antibody used recognizes both 1–36 and 3–36 forms of human PYY. Sensitivity was 2.5 pmol/l. Intra- and interassay CV were 2.9 and 7.1%, respectively. Plasma total ghrelin was measured with a commercially available radioimmunoassay (RIA) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA) which measures total circulating ghrelin concentrations. The intra- and interassay coefficients of variation were 6.2% and 9.0%, respectively. IGF-I was measured by two-site, solid-phase, chemiluminescent enzyme immunometric assay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA). The assay demonstrated an analytical sensitivity of 2.35 nmol/l and showed less than 5% cross-reactivity with insulin at high concentrations. Interassay coefficients of variation were 8% and 6.6% for samples with IGF-I-values 6.54 nmol/l and 21.78 nmol/l, respectively. Insulin was determined by immunochemiluminescence method (IMMULITE DPC, Los Angeles, CA, USA). The antiserum was specific for insulin with a low cross-reactivity with proinsulin (13.3%). Interassay coefficients of variation for insulin at 106.9 pmol/l and at 353.7 pmol/l were 4.8% and 6.5%, respectively. Glucose was determined by the oxidase method. We used the homeostatic model assessment sensitivity index (HOMA-IR)³⁰ to estimate insulin resistance. Six-hour-postprandial area under the curve (6-h-p-AUC) was calculated for insulin, glucose, PYY and ghrelin concentrations by the trapezoid method.

Statistical analyses

SPSS version 11.5 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the SAS system 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) were used for data analysis. General Lineal Model for repeated measures with Dunnett's method was used to compare mean ghrelin and PYY baseline concentrations with the postprandial values in each group of subjects. Longitudinal analyses using a mixed-effects model³¹ were performed to compare postprandial ghrelin and PYY behaviour between groups. One-way ANOVA with post hoc multiple comparisons using Bonferroni correction was used to compare the three groups of subjects. Spearman's correlation tests were also used to evaluate the relationship between variables. All *P*-values were two-sided and a *P* < 0.05 was considered to be significant. Results were expressed as mean ± SEM.

Results

Baseline characteristics of subjects are shown in Table 1 and Table 2. Lean subjects showed a lower BMI and percentage of body fat than the other two groups.

Fasting study

IGF-I levels were lower in PWS patients than in lean subjects (Table 1 and Table 2). Fasting glucose were not different between the three groups. Fasting insulin and HOMA-IR were higher in obese subjects than in PWS and lean subjects (Table 1). Fasting ghrelin levels were higher in PWS than in the other two groups, and obese patients showed lower fasting ghrelin levels than the lean group (Table 1). Fasting PYY concentrations were lower in patients with PWS than in lean subjects but similar to those in obese patients (Table 1 and Table 2).

Table 1. Baseline anthropometric and biochemical characteristics of patients

	Prader-Willi syndrome (PWS) (n = 7)	Obese (n = 16)	Lean (n = 42)
Sex (Male/Female)	6/1	10/6	34/8
Age (years)	24.3 ± 2.5	26.4 ± 1.1	22.4 ± 1.6
BMI (kg/m ²)	41.6 ± 4.6*	40.1 ± 4.3*	20.2 ± 1.4
Body fat (%)	42.7 ± 2.6*	41.6 ± 2.8*	13.7 ± 1.3
IGF-1 (nmol/l)	11.5 ± 2.4†	19.8 ± 2.4	26.7 ± 0.6
Glucose (mmol/l)	5.16 ± 0.24	5.26 ± 0.10	5.03 ± 0.13
Insulin (pmol/l)	57.9 ± 9.2	79.9 ± 6.8†‡	31.8 ± 1.6
Homa-IR (mm mU/l)	1.84 ± 0.60	3.58 ± 0.24†‡	1.72 ± 0.12
Ghrelin (pmol/l)	236.5 ± 49.5†	132.8 ± 9.9†‡	182.5 ± 13.4
PYY (pmol/l)	53.2 ± 6.5†	69.3 ± 5.4	84.6 ± 3.9

Data are mean ± SEM. **P* = 0.001 and †*P* < 0.05 vs. lean subjects, ‡*P* < 0.05 vs. PWS.

BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment index (mm mU/l).

Table 2. Baseline anthropometric and biochemical characteristics of patients that participated in the postprandial study

	Prader-Willi syndrome (PWS) (n = 7)	Obese (n = 7)	Lean (n = 7)
Sex (Male/Female)	6/1	6/1	6/1
Age (years)	24.3 ± 2.5	25.0 ± 1.5	24.1 ± 2.6
BMI (kg/m ²)	41.6 ± 4.6*	41.1 ± 3.1*	21.5 ± 1.1
Body fat (%)	42.7 ± 2.6*	40.4 ± 3.8*	12.3 ± 1.4
IGF-1 (nmol/l)	11.5 ± 2.4†	17.2 ± 3.0	25.0 ± 2.6
Glucose (mmol/l)	5.16 ± 0.24	4.61 ± 0.27	5.13 ± 0.34
Insulin (pmol/l)	57.9 ± 9.2	58.9 ± 10.4	38.6 ± 5.6
Homa-IR (mm mU/l)	1.84 ± 0.60	1.67 ± 0.29	1.22 ± 0.17
Ghrelin (pmol/l)	236.5 ± 49.5	148.8 ± 16.6	184.5 ± 30.6
PYY (pmol/l)	53.2 ± 6.5†	72.6 ± 7.4	80.1 ± 4.2

Data are mean ± SEM. **P* = 0.001 and †*P* < 0.05 vs. lean subjects.

BMI, body mass index; HOMA-IR: homeostatic model assessment index (mm mU/l).

6-h-postprandial study

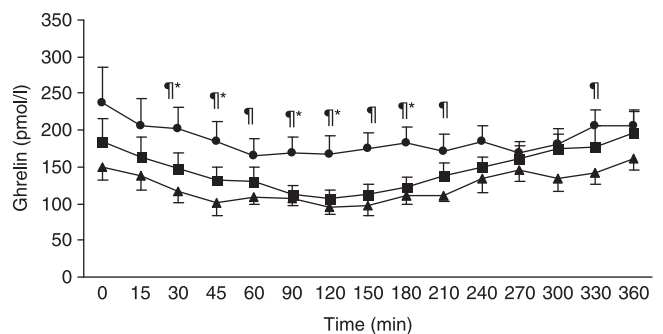
Glucose and insulin levels. The 6-h-p-AUC for glucose was similar in the three groups. However, the 6-h-p-AUC for insulin in PWS patients and obese subjects were higher than that of lean subjects (Table 3).

Ghrelin levels. There was a decrease in ghrelin levels postprandially in all the three groups (Fig. 1). In patients with PWS there was a significant decrease at 60, 90, 120, 210 and 270 min, with a nadir of 29% of change from baseline at 60 min (236.49 ± 49.49 vs. 165.58 ± 23.06 pmol/l, *P* = 0.017). Obese subjects also showed a significant decrease in ghrelin levels between 45 and 150 min with a nadir of 35.8% of change from baseline at 120 min (148.82 ± 16.57

Table 3. Six-hour-postprandial area under the curve (6-h-pAUC) of glucose, insulin and ghrelin in patients with Prader-Willi syndrome (PWS), obese and lean subjects

	Prader-Willi syndrome (PWS) (n = 7)	Obese (n = 7)	Lean (n = 7)
6-h-p-AUC			
Glucose (mmol/l × min)	2057.6 ± 177.0	1888.8 ± 94.2	1836.3 ± 88.6
Insulin (nmol/l × min)	203.1 ± 18.9*	276.2 ± 110.1*	95.1 ± 17.3
Ghrelin (nmol/l × min)	65.6 ± 6.9†	43.7 ± 4.2	51.5 ± 6.5
PYY (nmol/ml × min)	21.4 ± 1.4*†	29.1 ± 2.7	31.1 ± 1.9

Data are mean ± SEM. **P* < 0.05 vs. lean subjects, †*P* < 0.05 vs. obese patients.

**Fig. 1** Postprandial ghrelin levels in Prader-Willi syndrome (PWS) patients (●), obese (▲) and lean subjects (■). **P* < 0.05 PWS patients vs. lean subjects, †*P* < 0.05 PWS patients vs. obese subjects.

vs. 95.43 ± 10.40 pmol/l, *P* = 0.002). Lean subjects showed a significant decrease in ghrelin levels between 45 and 210 min; with a nadir of 41.9% of change from baseline at 120 min (184.52 ± 30.61 vs. 107.21 ± 11.84 pmol/l, *P* < 0.0001). Comparing the three groups, patients with PWS showed lower postprandial ghrelin decrease than the other two groups (*P* < 0.0001) and therefore a higher 6-h-p-AUC for ghrelin than obese subjects (Table 3). Obese and lean subjects showed a similar postprandial ghrelin decrease and a similar 6-h-p-AUC for ghrelin (Table 3).

PYY levels. PYY postprandial response was blunted in patients with PWS (60 min: 61.05 ± 3.78 pmol/l, *P* = 0.326), but not in the other two groups that showed a peak at 60 min (obese: 90.88 ± 6.69 pmol/l, *P* = 0.017; lean: 97.25 ± 3.67 pmol/l, *P* = 0.009) (Fig. 2).

In patients with PWS, 6-h-p-AUC for PYY was lower as compared to the other two groups (Table 3).

Correlations. In all three groups, fasting PYY levels correlated negatively with fasting ghrelin levels (Fig. 3a) and with ghrelin 6-h-p-AUC (Fig. 3b). Ghrelin 6-h-p-AUC and PYY 6-h-p-AUC showed a tendency to negatively correlate (*R* = -0.377, *P* = 0.092). In patients with PWS, ghrelin postprandial decrease and PYY postprandial increase showed a negative correlation at 60 min (Fig. 4a) and at

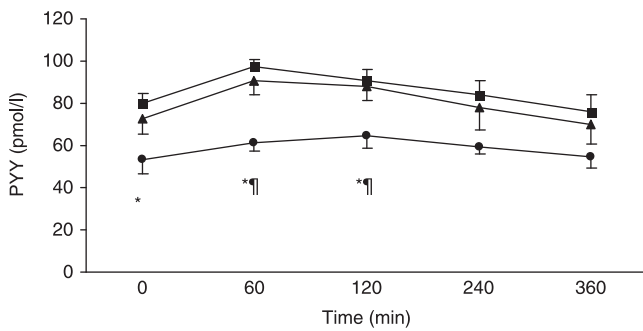


Fig. 2 Postprandial PYY levels in Prader-Willi syndrome (PWS) patients (●), obese (▲) and lean subjects (■). * $P < 0.05$ PWS patients vs. lean subjects, † $P < 0.05$ PWS patients vs. obese subjects.

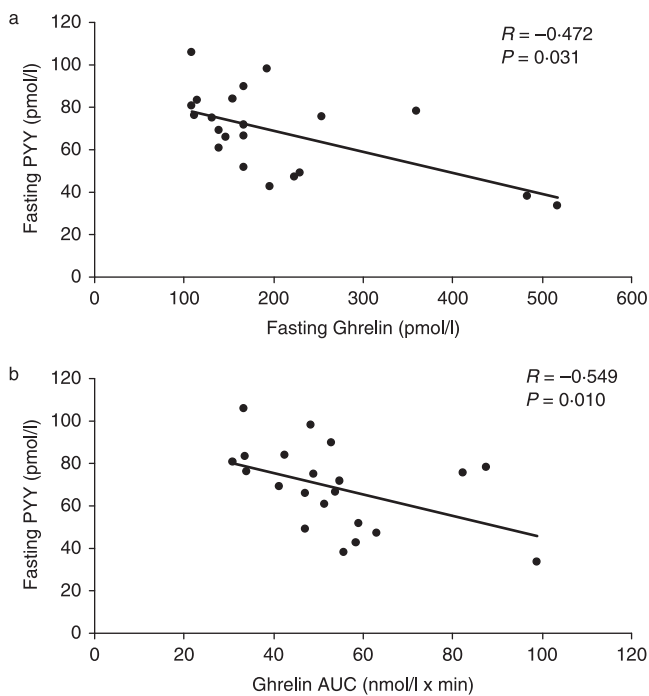


Fig. 3 Correlations between fasting PYY levels and (a) fasting ghrelin levels and (b) ghrelin 6-h-postprandial area under the curve (ghrelin-6-h-p-AUC) in all the patients together.

120 min (Fig. 4b) but neither of them correlated with insulin or glucose postprandial increase. When stepwise multiple regression analyses were applied with ghrelin 6-h-p-AUC as the dependent variable and insulin 6-h-p-AUC, glucose 6-h-p-AUC and PYY 6-h-p-AUC as possible predictors, none of them entered in the model. However, when fasting PYY, fasting insulin and fasting glucose were used as possible predictors, the only variable associated with ghrelin 6-h-p-AUC was fasting PYY (Table 4). No correlations were observed between ghrelin or PYY at both fasting and 6-h-p-AUC and the following variables: BMI, percentage of body fat, IGF-I, fasting glucose and insulin levels and HOMA-IR in each separate group or in all 3 groups together.

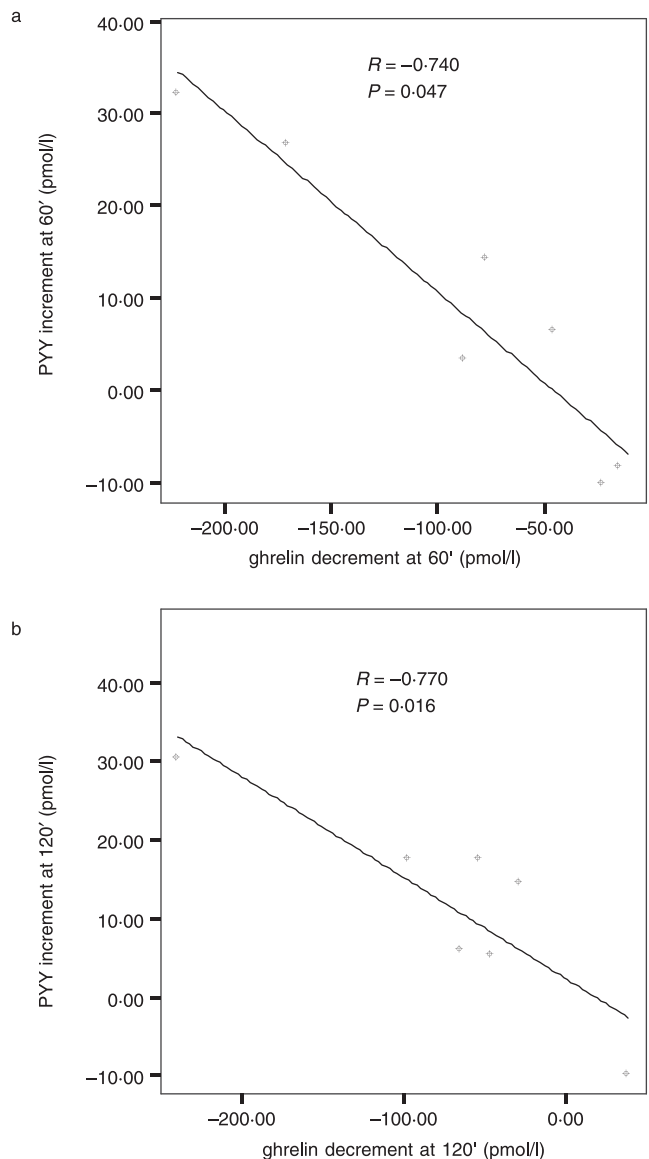


Fig. 4 Correlations between the postprandial decrease in ghrelin levels and the postprandial increase in PYY levels at (a) 60' and at (b) 120' in patients with Prader-Willi syndrome (PWS).

Table 4. Stepwise multiple regression analyses with all the patients (two different models)

Variables	Model 1	Model 2
Dependent	Ghrelin-6-h-p-AUC	Ghrelin-6-h-p-AUC
Independent	Insulin-6-h-p-AUC Glucose-6-h-p-AUC PYY-6-h-p-AUC	Fasting insulin Fasting glucose Fasting PYY
Entered in the model	None	Fasting PYY*

* $\beta = -0.464$, $P = 0.034$.

6-h-p-AUC, 6-h-postprandial area under the curve.

Discussion

The present study shows that ghrelin levels decreased postprandially in adult patients with PWS to a lesser extent than in obese and lean subjects. Our data also shows low fasting PYY levels and a blunted postprandial response in individuals with PWS.

The decrease in ghrelin levels observed in patients with PWS began later (60 min after the meal) and it was of lower magnitude (nadir of 29% at 60 min) than the one observed in obese or lean subjects. Therefore ghrelin levels measured by the AUC were higher in patients with PWS than in obese subjects. As patients with PWS spend most of the time in postprandial state due to their hyperphagia, ghrelin area under the curve may represent better ghrelin levels than a simple fasting sample.

Our finding is in agreement with three other studies performed in children^{22,25,26} and in adults²⁷ with PWS that reported the presence of ghrelin decrease after a meal. However, it is in discordance with another study²¹ that reported a lack of ghrelin suppression after a standard liquid meal drunk in no more than 25 min until satiety. It is possible that the shorter duration of their study could explain their negative results.

We also observed low PYY levels and a blunted postprandial response in PWS. Although our finding is in accordance with one study performed in children with PWS that showed low fasting PYY levels²⁸ it is in discordance with two others in adult patients with PWS that reported normal fasting and postprandial PYY levels after different calorie standard meals.^{24,27} However, the absence of any comparison with a control group²⁴ lead the authors to believe that the possibility of impaired PYY release as a contributor to the delayed satiety in patients with PWS could not be excluded.

In the present study, ghrelin levels were also suppressed in non-PWS obese patients after the meal in accordance with most^{19,26,32,33} but not all^{25,34} previous studies in obese subjects. On the other hand, fasting PYY levels and their postprandial response in obese subjects were preserved and showed a normal peak at around 60 min in agreement to other authors.^{33,35} In contrast, most previous studies showed low fasting PYY levels in obese adults¹⁹ or children³⁶ or a blunted postprandial response.^{19,33} The lack of differences between obese and lean subjects in the present study may be accounted for by the limited number of patients or the composition of the food consumed during the meal challenge.³⁷ Insulin resistance does not seem to play a role in PYY levels, because no relationship was observed between HOMA index and PYY levels as described previously.³⁸

Several mechanisms have been proposed to explain the hyperghrelinaemia observed in patients with PWS. One of them is the GH deficiency accompanying this syndrome. As ghrelin is an endogenous GH secretagogue, GH could be a potential inhibitor of ghrelin secretion. In our study, none of the patients were under GH treatment and their IGF-I levels were low; however, no relationship was observed between IGF-I and ghrelin levels. Therefore, it is unlikely that GH levels were the main determinants of the lesser ghrelin suppression postprandially.

Insulin could be another potential factor as many studies^{39,40} but not all¹⁶ showed a suppressive effect of insulin administration on

ghrelin. In this present study, although we observed a relative fasting hypoinsulinaemia in PWS as compared to obese patients as previously described^{27,41,42} the insulin response to the meal was identical for obese and PWS patients and yet, ghrelin suppression was lesser in PWS. Thus, insulin cannot be the only factor explaining the difference in ghrelin suppression. Furthermore, fasting and postprandial glucose response and HOMA index that may both influence ghrelin levels^{32,43–45} did not show any correlation with ghrelin levels. Therefore, other mechanisms related to ghrelin regulation must be involved. Leptin, an adipocyte-derived plasma hormone that acts in the brain to produce satiety does not seem to play a role in PWS eating disorder as there is no evidence of leptin plasma concentration or leptin receptor abnormalities in these patients.^{46–50} PYY is an anorexigenic peptide that directly inhibits ghrelin-activated neurones in rats⁵¹ and decreases postprandial ghrelin levels in humans,¹⁹ an effect that might potentiate its own effect on satiety in healthy subjects.⁵² In spite of the small number of subjects studied, we found a negative correlation between both fasting ghrelin and PYY levels and fasting PYY levels were the only predictor for ghrelin postprandial suppression. Moreover, the negative correlation observed between postprandial PYY and ghrelin may indicate that the blunted postprandial PYY response could be responsible for the lesser postprandial ghrelin suppression. Hence it is possible that PYY could be at least a partial explanation for the hyperghrelinaemia observed in PWS. In support of this possibility, a similar negative interaction between ghrelin and PYY has been recently described in patients with bulimia nervosa,^{53,54} African-American subjects³⁸ and in intensive care unit patients.⁵⁵

Recent studies have shown that ghrelin stimulates acid gastric secretion and gastric motility and emptying.^{56–58} This faster prokinetic action could be the determinant of the blunted PYY response. However, in PWS gastric emptying is reduced despite higher ghrelin levels⁵⁹ so this mechanism does not seem to be feasible.

On the other hand, a genetic relationship between PYY, ghrelin and PWS imprinting disorder has not yet been demonstrated as the genes for either these peptides or their receptors are localized on different chromosomes and, in addition, gene expression of these receptors in brain from subjects with and without PWS was similar.⁶⁰

In conclusion, the present study shows that the magnitude of the postprandial ghrelin suppression is lesser in PWS than in obese and lean subjects and that the PYY response is blunted. Our data suggest that the changes of PYY and ghrelin postprandially are related in PWS. Further studies are needed to elucidate the importance of this modest finding and its relationship with the severe hyperphagia in PWS.

Acknowledgements

We thank Imma Gallach and Blanca Macho for expert technical assistance and the *Associació Catalana de Síndrome de Prader-Willi* and all the subjects and their families for their kind participation. We are also indebted to *Servei d'Estadística UAB* for helping in statistical analysis. This study was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS): Red de Grupos de Diabetes Mellitus (RGDM 03/212), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.

References

- 1 Butler, M.G. (1990) Prader–Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *American Journal of Medical Genetics*, **35**, 319–332.
- 2 Cassidy, S.B. (1997) Prader–Willi syndrome. *Journal of Medical Genetics*, **34**, 917–923.
- 3 Holm, V.A., Cassidy, S.B., Butler, M.G., Hanchett, J.M., Greenswag, L.R., Whitman, B.Y. & Greenberg, F. (1993) Prader–Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*, **91**, 398–402.
- 4 Lurance, B.M., Brito, A. & Wilkinson, J. (1981) Prader–Willi syndrome after age 15 years. *Archives of Disease in Childhood*, **56**, 181–186.
- 5 Burman, P., Ritzen, E.M. & Lindgren, A.C. (2001) Endocrine dysfunction in Prader–Willi syndrome: a review with special reference to GH. *Endocrine Review*, **22**, 787–799.
- 6 Sainsbury, A., Cooney, G.J. & Herzog, H. (2002) Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, **16**, 623–637.
- 7 Druce, M.R., Small, C.J. & Bloom, S.R. (2004) Minireview: gut peptides regulating satiety. *Endocrinology*, **145**, 2660–2665.
- 8 Dhillon, W.S. & Bloom, S.R. (2004) Gastrointestinal hormones and regulation of food intake. *Hormone and Metabolic Research*, **36**, 846–851.
- 9 Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656–660.
- 10 Hinton, E.C., Holland, A.J., Gellatly, M.S.N., Soni, S., Patterson, M., Ghatei, M.A. & Owen, A.M. (2006) Neural representations of hunger and satiety in Prader–Willi syndrome. *International Journal of Obesity*, **30**, 313–321.
- 11 Giménez-Palop, O. & Caixàs, A. (2004) Ghrelin: from growth hormone secretion to energy balance regulation. *Endocrinología y Nutrición*, **51**, 464–472.
- 12 Korbonits, M., Goldstone, A.P., Gueorguiev, M. & Grossman, A.B. (2004) Ghrelin—a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **25**, 27–68.
- 13 Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E. & Weigle, D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**, 1–6.
- 14 Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Ma, M.K., Dellinger, E.P. & Purnell, J.Q. (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric by-pass surgery. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1623–1630.
- 15 Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R. & Folwaczny, C. (2001) Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, **24**, RC19–RC21.
- 16 Caixàs, A., Bashore, C., Nash, W., Pi-Sunyer, F.X. & Laferrère, B. (2002) Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 1902–1906.
- 17 Adrian, T.E., Ferri, G.L., Bacarese-Hamilton, A.J., Fuessl, H.S., Polak, J.M. & Bloom, S.R. (1985) Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, **89**, 1070–1077.
- 18 Tschöp, M., Castañeda, T.R., Joost, H.G., Thöne-reineke, C., Ortman, S., Klaus, S., Hagan, M.M., Chandler, P.C., Oswald, K.D., Benoit, S.C., Seeley, R.J., Kinzig, K.P., Moran, T.H., Beck-Sickingler, A.G., Koglin, N., Rodgers, R.J., Blundell, J.E., Ishii, Y., Beattie, A.H., Holch, P., Allison, D.B., Raun, K., Madsen, K., Wulff, B.S., Stidsen, C.E., Birringer, M., Kreuzer, O.J., Schindler, M., Arndt, K., Rudolf, K., Mark, M., Deng, X.Y., Withcomb, D.C., Halem, H., Taylor, J., Dong, J., Datta, R., Culler, M., Craney, S., Flora, D., Smiley, D. & Heiman, M.L. (2004) Does gut hormone PYY_{3–36} decrease food intake in rodents?. *Nature*, **430**, 1–3 (Brief Communications).
- 19 Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2003) Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY_{3–36}. *New England Journal of Medicine*, **349**, 941–948.
- 20 Cummings, D.E., Clement, K., Purnell, J.Q., Vaisse, C., Foster, K.E., Frayo, R.S., Schwartz, M.W., Basdevant, A. & Weigle, D.S. (2002) Elevated plasma ghrelin levels in Prader–Willi syndrome. *Nature Medicine*, **8**, 643–644.
- 21 Delparigi, A., Tschöp, M., Heiman, M.L., Salbe, A.D., Vozarova, B., Sell, S.M., Bunt, J.C. & Tataranni, P.A. (2002) High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader–Willi Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 5461–5464.
- 22 Haqq, A.M., Stadler, D.D., Rosenfeld, R.G., Pratt, K.L., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Lafranchi, S.H., Cummings, D.E. & Purnell, J.Q. (2003) Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octeotride therapy in children with Prader–Willi Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 3573–3576.
- 23 Höybye, C., Barkeling, B., Espelund, U., Petersson, M. & Thorén, M. (2003) Peptides associated with hyperphagia in adults with Prader–Willi syndrome before and during GH treatment. *Growth Hormone & IGF Research*, **13**, 322–327.
- 24 Tan, T.M., Vanderpump, M., Khoo, B., Patterson, M., Ghatei, M.A. & Goldstone, A.P. (2004) Somatostatin infusion lowers plasma ghrelin without reducing appetite in adults with Prader–Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 4162–4165.
- 25 Bizarri, C., Rigamonti, A.E., Giannone, G., Berardinelli, R., Cella, S.G., Cappa, M. & Müller, E.E. (2004) Maintenance of a normal meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in children with Prader–Willi syndrome. *Hormone and Metabolic Research*, **36**, 164–169.
- 26 Paik, K.H., Choe, Y.H., Park, W.H., Oh, Y.J., Kim, A.H., Chu, S.H., Kim, S.W., Kwon, E.K., Han, S.J., Shon, W.Y. & Jin, D.K. (2006) Suppression of acylated ghrelin during oral glucose tolerance test is correlated with whole body insulin sensitivity in children with Prader–Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 1876–1881.
- 27 Goldstone, A.P., Patterson, M., Kalingag, N., Ghatei, M.A., Brynes, A.E., Bloom, S.R., Grossman, A. & Korbonits, M. (2005) Fasting and post-prandial hyperghrelinemia in Prader–Willi syndrome is partially explained by hypoinsulinemia, and is not due to peptide YY_{3–36} deficiency or seen in hypothalamic obesity due to craniopharingioma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 2681–2690.
- 28 Butler, M.G., Bittel, C.D. & Talebizadeh, Z. (2004) Plasma peptide YY and ghrelin levels in infants and children with Prader–Willi syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **17**, 1177–1184.
- 29 Caixàs, A., Giménez-Palop, O., Giménez-Pérez, G., Potau, N., Berlanga, E., González-Clemente, J.M., Arroyo, J., Laferrère, B. & Mauricio, D. (2006) Postprandial adiponectin levels are unlikely to contribute to the pathogenesis of obesity in Prader–Willi syndrome. *Hormone Research*, **65**, 39–45.
- 30 Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. & Turner, R. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**, 412–419.
- 31 Laird, N. & Ware, J.H. (1982) Random effects model for longitudinal data. *Biometrics*, **38**, 963–974.

- 32 Shijia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K. & Matsukura, S. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 240–244.
- 33 Stock, S., Lechner, P., Wong, A., Ghatei, M.A., Kieffer, T.J., Bloom, S.R. & Chanoine, J.P. (2005) Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 2161–2168.
- 34 English, P.J., Ghatei, M.A., Malik, I.A., Bloom, S.R. & Wilding, J.P.H. (2002) Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 2984–2987.
- 35 Kim, B., Carlson, O.D., Jang, H., Elahi, D., Berry, C. & Egan, J.M. (2005) Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 6665–6671.
- 36 Roth, C.L., Enriori, P.J., Harz, K., Woelfle, J., Cowley, M.A. & Reinehr, T. (2005) Peptide YY is a regulator of energy homeostasis in obese children before and after weight loss. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 6386–6391.
- 37 Wynne, K., Stanley, S. & Bloom, S. (2004) The gut and regulation of body weight. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 2576–2582.
- 38 Bacha, F. & Arslanian, S.A. Ghrelin and peptide YY in youth: are there race-related differences? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 3117–3122.
- 39 Flanagan, D.E., Evans, M.L., Monsod, T.P., Rife, F., Heptulla, R.A., Tamborlane, W.V. & Sherwin, R.S. (2003) The influence of insulin on circulating ghrelin. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **284**, E313–E316.
- 40 Saad, M.F., Bernaba, B., Hwu, C., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kosogov, E. & Boyadjian, R. (2002) Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3997–4000.
- 41 Goldstone, A.P., Thomas, E.L., Brynes, A.E., Castroman, G., Edwards, R., Ghatei, M.A., Frost, G., Holland, A.J., Grossman, A.B., Korbonits, M., Bloom, S.R. & Bell, J.D. (2004) Elevated fasting plasma ghrelin in Prader–Willi syndrome adults is not solely explained by their reduced adiposity and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 1718–1726.
- 42 Eiholzer, U., Stutz, K., Weinmann, C., Torresani, T., Molinari, L. & Prader, A. (1998) Low insulin, IGF-1 and IGFBP-3 levels in children with Prader–Labhart–Willi syndrome. *European Journal of Pediatrics*, **157**, 890–893.
- 43 McLaughlin, T., Abbasi, F., Lamendola, C., Frayo, R.S. & Cummings, D.E. (2004) Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistance obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 1630–1635.
- 44 Ikezaki, A., Hosoda, H., Ito, K., Iwama, S., Miura, N., Matsuoka, H., Kondo, C., Kojima, M., Kangawa, K. & Sugihara, S. (2002) Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes*, **51**, 3408–3411.
- 45 Gottero, C., Bellone, S., Rapa, A., van Koetsveid, P., Vivenza, D., Prodám, F., Benso, A., Destefanis, S., Gauna, C., Bellone, J., Hofland, L., van der Lely, A.J., Bona, G., Ghigo, E. & Broglio, F. (2003) Standard light breakfast inhibits circulating ghrelin level to the same extent of oral glucose load in humans, despite different impact on glucose and insulin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**, 1203–1207.
- 46 Weigle, D.S., Ganter, S.L., Kuijper, J.L., Leonetti, D.L., Boyko, E.J. & Fujimoto, W.Y. (1997) Effect of regional fat distribution and Prader–Willi syndrome on plasma leptin levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **82**, 566–570.
- 47 Pietrobello, A., Allison, D.B., Faith, M.S., Beccaria, L., Bosio, L., Chiumello, G., Campfield, L.A. & Heymsfield, S.B. (1998) Prader–Willi syndrome: relationship of adiposity to plasma leptin levels. *Obesity Research*, **6**, 196–201.
- 48 Bueno, G., Moreno, L.A., Pineda, I., Campos, J., Ruibal, J.L., Juste, M.G., Casado, E. & Bueno, M. (2000) Serum leptin concentrations in children with Prader–Willi syndrome and non-syndromal obesity. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **13**, 425–430.
- 49 Myers, S.E., Davis, A., Whitman, B.Y., Santiago, J.V. & Landt, M. (2000) Leptin concentrations in Prader–Willi syndrome before and after growth hormone replacement. *Clinical Endocrinology*, **52**, 101–105.
- 50 Goldstone, A.P., Brynes, A.E., Thomas, E.L., Bell, J.D., Frost, G., Holland, A., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2002) Resting metabolic rate, plasma leptin concentrations, leptin receptor expression, and adipose tissue measured by whole-body magnetic resonance imaging in women with Prader–Willi syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, **75**, 468–475.
- 51 Riediger, T., Bothe, C., Becskei, C. & Lutz, T.A. (2004) Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology*, **79**, 317–326.
- 52 Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D. & Bloom, S.R. (2002) Gut hormone PYY_{3–36} physiologically inhibits food intake. *Nature*, **418**, 650–654.
- 53 Kojima, S., Nakahara, T., Nagai, N., Muranaga, T., Tanaka, M., Yasuhara, D., Masuda, A., Date, Y., Ueno, H., Nakazato, M. & Naruo, T. (2005) Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clinical Endocrinology*, **62**, 74–78.
- 54 Monteleone, P., Martiadis, V., Rigamonti, A.E., Fabrazzo, M., Giordani, C., Muller, E.E. & Maj, M. (2005) Investigation of peptide YY and ghrelin responses to a test meal in bulimia nervosa. *Biological Psychiatry*, **57**, 926–931.
- 55 Nematy, M., O'flynn, J.E., Wandrag, L., Brynes, A.E., Brett, S.J., Patterson, M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. & Frost, G.S. (2005) Changes in appetite related gut hormones in intensive care unit patients: a pilot cohort study. *Critical Care*, **10**, R10.
- 56 Yacabi, K., Ro, S., Onouhi, T., Tanaka, T., Ohno, S., Miura, S., Johno, Y. & Takayama, K. (2006) Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Digestive Diseases and Sciences*, **51**, 1313–1321.
- 57 Tack, J., Depoortere, I., Bisschops, R., Delpoortere, C., Coulie, B., Meulemans, A., Janssens, J. & Peeters, T. (2006) Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut*, **55**, 327–333.
- 58 Levin, F., Edholm, T., Schmidt, P.T., Gryback, P., Jacobsson, H., Degerblad, M., Hoybye, C., Holst, J.J., Rehfeld, J.F., Hellstrom, P.M. & Naslund, E. (2006) Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal weight humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **91**, 3296–3302.
- 59 Choe, Y.H., Jin, D.K., Kim, S.E., Song, S.Y., Paik, K.H., Park, H.Y., Oh, Y.J., Kim, A.H., Kim, J.S., Kim, C.W., Chu, S.H., Kwon, E.K. & Lee, K.H. (2005) Hyperghrelinemia does not accelerate gastric emptying in Prader–Willi syndrome patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 3367–3370.
- 60 Talebizadeh, Z., Kibiryeba, N., Bittel, D.C. & Butler, M.G. (2005) Ghrelin, peptide YY and their receptors: gene expression in brain from subjects with and without Prader–Willi syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, **15**, 707–711.

10.2. ARTÍCULO 2: "Los niveles de adiponecina postprandiales no parece que contribuyan a la patogénesis de la obesidad en el Síndrome de Prader-Willi"

Postprandial Adiponectin Levels Are Unlikely to Contribute to the Pathogenesis of Obesity in Prader-Willi Syndrome

Assumpta Caixàs^a Olga Giménez-Palop^a Gabriel Giménez-Pérez^a
Neus Potau^c Eugenio Berlanga^b José-Miguel González-Glemente^a
Jaume Arroyo^a Blandine Laferrère^d Dídac Mauricio^a

^aDiabetes Endocrinology and Nutrition Unit, Hospital de Sabadell, and ^bUDIAT, Institut Universitari Parc Taulí, Sabadell, and ^cHormonal Laboratory, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona, Spain;

^dNew York Obesity Research Center, St Luke's-Roosevelt Hospital, Columbia University, New York, N.Y., USA

Key Words

Prader-Willi syndrome · Adiponectin · Insulin resistance · Postprandial state and adipocytokines

Abstract

Aim: To investigate fasting and postprandial adiponectin levels in PWS patients as compared to obese and lean subjects and whether they could contribute to the pathogenesis of obesity in this syndrome. **Methods:** We studied 7 patients with PWS, 16 obese patients and 42 lean subjects for the fasting study. From this group, we evaluated 7 patients with PWS, 7 age-sex-BMI-matched obese non-PWS patients and 7 age-sex-matched lean subjects before and after the administration of 3,139.5 kJ (750 kcal) of a standard liquid meal (53.2% carbohydrate, 30% fat, 16.7% protein) after an overnight fast. Blood samples were obtained every 15 min for the first hour and every 30 min thereafter until 6 h. Adiponectin, IGF-I, glucose, triglycerides, cholesterol, and insulin were measured. **Results:** Fasting plasma adiponectin levels were lower in PWS than in lean subjects (5.24 ± 2.56 vs. 8.28 ± 4.63 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.041$) but higher than in obese patients (4.01 ± 1.27 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.047$). After the meal, adiponectin concentrations mildly decreased in PWS at time point 240 min, while in obese and lean subjects no changes

were observed. However, 6-hour postprandial AUC for adiponectin was similar in all three groups. **Conclusion:** Fasting adiponectin levels are low in PWS, but they are so mildly modulated postprandially that these changes do not seem significant for the pathogenesis of obesity in this syndrome.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

Prader-Willi syndrome (PWS) is a genetic disorder due to the absence or lack of expression of the paternally inherited genetic material located in region 15q11,q13. The clinical features include neonatal hypotony, mental retardation, behavioral abnormalities and the absence [1] of satiety with progressive massive obesity [2]. They may also present endocrinological disorders such as growth hormone (GH) deficiency and hypogonadotropic hypogonadism as a result of hypothalamic-pituitary dysfunction [3].

During the past decades, many studies have tried to elucidate the potential causes of hyperphagia in patients with PWS. In this sense, a lack of pancreatic polypeptide [4] or high levels of the orexigenic hormone ghrelin [5–8] have been suggested to contribute to the absence of satiety

Table 1. Baseline characteristics of the subjects that participated in the fasting study

	PWS (n = 7)	Obese (n = 16)	Lean (n = 42)	p
Sex, M/F	6/1	10/6	34/8	NS
Age, years	24.3 ± 6.7	26.4 ± 4.3	22.4 ± 10.1	NS
BMI, kg/m ²	41.6 ± 12.3 ^a	40.1 ± 17.2 ^a	20.2 ± 9.3	0.001
Waist, cm	109.2 ± 45.3 ^a	111.4 ± 39.6 ^a	67.7 ± 9.2	0.001
Body fat, %	42.7 ± 7.0 ^a	41.6 ± 11.1 ^a	13.7 ± 8.7	0.001
IGF-I, nmol/l	11.5 ± 6.2 ^a	19.8 ± 9.5	26.7 ± 4.0	0.039
Glucose, mmol/l	5.16 ± 0.64	5.26 ± 0.36	5.03 ± 0.88	NS
Insulin, pmol/l	57.9 ± 34.6	79.9 ± 27.2 ^{a, c}	31.8 ± 10.7	0.040 ^a
Homa-IR	1.84 ± 1.20	3.58 ± 0.98 ^{a, c}	1.72 ± 0.76	0.048 ^c
McAuley index	8.73 ± 1.95	6.35 ± 0.19 ^a	11.31 ± 1.73	0.038 ^a
Cholesterol, mmol/l	4.52 ± 0.95	4.98 ± 0.65	2.71 ± 0.64	0.042 ^c
Triglyceride, mmol/l	0.87 ± 0.21	0.87 ± 0.41	0.69 ± 0.10	NS
Adiponectin, µg/ml	5.24 ± 2.56 ^b	4.01 ± 1.27 ^{a, c}	8.28 ± 4.63	0.041 ^b
				0.036 ^a
				0.047 ^c

NS = Not statistically significant: ^{a, b} vs. lean subjects, ^c vs. PWS subjects.

Data are shown as mean ± SD. One-way analysis of variance (ANOVA) with posthoc multiple comparisons using Bonferroni correction was used to compare the three groups of subjects.

in these patients. As a result of hyperphagia, morbid obesity and its complications are a major cause of morbidity and mortality in PWS patients [9].

Adiponectin is a complement-related 244 amino acid protein produced exclusively by white adipose tissue. It belongs to the family of adipokines, a group of proteins that may modulate the effects of body mass on health [10, 11]. Some studies suggest that it is an important insulin sensitivity regulator [12, 13] and could exert some vascular protective effects [14–16]. Accordingly, low adiponectin concentrations have been reported in obese and/or diabetic subjects as well as in cardiovascular disease [12, 17–20]. In rats, adiponectin has been shown to stimulate thermogenesis and therefore to protect against obesity [21]. In this sense, low adiponectin levels could contribute to the low energy expenditure previously described in PWS [22, 23] and consequently to the pathogenesis of obesity. Furthermore, a decrease in adiponectin levels in the postprandial state has been observed by some authors [24] but not by others [17, 18, 25–27]. Since PWS patients are continuously eating, we found it of interest to measure adiponectin levels in the postprandial state. We also compared them to those of matched obese and healthy controls in order to evaluate whether low adiponectin levels could contribute to the pathogenesis of obesity in this syndrome.

Materials and Methods

Subjects

Fasting Study

Seven adult patients with genetically diagnosed PWS, 16 obese subjects and 42 lean controls were studied (table 1).

Postprandial Study

From the fasting study, 7 patients with PWS, 7 age-sex-BMI-matched obese non-PWS patients and 7 age-sex-matched lean subjects were chosen for the postprandial study (table 2).

Patients were recruited from the Endocrinology Clinic and informed consent was obtained from them (obese subjects) or their parents (PWS patients) prior to starting the study. The matched lean controls were hospital staff who also signed an informed consent. All subjects were Caucasian and their weight was stable for at least 3 months before inclusion in the study. All males with PWS were under testosterone replacement for hypogonadism and 3 had GH deficiency in childhood that had been treated until puberty. The protocol was approved by the Institutional Ethics Committee.

Experimental Methods

Subjects were admitted to the Unit at 8 a.m. after an overnight fast of at least 10 h. After bladder evacuation, anthropometrical parameters were determined by bioelectrical impedancimetry (TANITA, body composition analyzer TBF-300). A catheter was then inserted into the antecubital vein and the line was kept with saline infusion. Blood samples were drawn for the fasting study. For the postprandial study blood samples were drawn before and after a standard liquid meal (Ensure, Abbott Lab, 3,139.5 kJ or

Table 2. Characteristics of the subjects that participated in the postprandial study

	PWS (n = 7)	Obese (n = 7)	Lean (n = 7)	p
Sex, M/F	6/1	6/1	6/1	NS
Age, years	24.3 ± 6.7	25.0 ± 4.1	24.1 ± 6.9	NS
BMI, kg/m ²	41.6 ± 12.3 ^a	41.1 ± 8.3 ^a	21.5 ± 3.0	0.001
Waist, cm	109.2 ± 45.3 ^a	108.1 ± 31.0 ^a	79.1 ± 9.2	0.001
Body fat, %	42.7 ± 7.0 ^a	40.4 ± 10.0 ^a	12.3 ± 3.8	0.001
IGF-I, nmol/l	11.5 ± 6.2 ^a	17.2 ± 8.0	25.0 ± 6.9	0.043
Glucose, mmol/l	5.16 ± 0.64	4.61 ± 0.71	5.13 ± 0.91	NS
Insulin, pool/l	57.9 ± 34.6	58.9 ± 27.5	38.6 ± 14.9	NS
Homa-IR	1.84 ± 1.20	1.67 ± 0.79	1.22 ± 0.46	NS
McAuley index	8.73 ± 1.95	8.43 ± 0.99	10.41 ± 2.27	NS
Cholesterol, mmol/l	4.52 ± 0.95	4.08 ± 0.88	3.75 ± 0.37	NS
Triglyceride, mmol/l	0.87 ± 0.21	0.86 ± 0.27	0.68 ± 0.29	NS
Adiponectin, µg/ml	5.24 ± 2.56	5.99 ± 4.11	6.04 ± 2.28	NS
Glucose AUC, 6 h, mmol/l × min	2,057 ± 468	1,888 ± 249	1,836 ± 234	NS
Insulin AUC, 6 h, ng/l × min	203 ± 86 ^a	276 ± 291 ^b	95 ± 45	0.043 ^a 0.045 ^b
Triglyceride AUC, 6 h, mmol/l × min	1,865 ± 558 ^a	1,864 ± 752 ^b	892 ± 689	0.042 ^a 0.041 ^b
Adiponectin AUC, 6 h, mg/l × min	1,755 ± 897	2,219 ± 1,398	2,188 ± 738	NS

NS = Not statistically significant: ^{a, b} vs. lean subjects.

Data are shown as mean ± SD. One-way analysis of variance (ANOVA) with posthoc multiple comparisons using Bonferroni correction was used to compare the three groups of subjects.

750 kcal, 53.2% carbohydrate, 30% fat, 16.7% protein) every 15 min for the first hour and every 30 min thereafter. Previous data using this meal showed good insulin and glucose response in lean subjects [28]. Plasma was separated and kept at -80°C until processed.

Assays were performed using commercially available methods. Adiponectin was determined by radioimmunoassay (LINCO Research Inc., St Charles, Mo., USA) with a sensitivity of 1 ng/ml. Intra- and interassay coefficients of variation were 3.8 and 8.5%, respectively. IGF-I was measured by two-site, solid-phase, chemiluminescent enzyme immunometric assay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles Calif., USA). The assay demonstrated an analytical sensitivity of 2.35 nmol/l and showed less than 5% cross-reactivity with insulin at high concentrations. Interassay coefficients of variation were 8 and 6.6% for samples with IGF-I values 6.54 and 21.78 nmol/l, respectively. Insulin was determined by immunochemiluminescence method (IMMULITE DPC, Los Angeles, Calif., USA). The antiserum was specific for insulin with low cross-reactivity with proinsulin (13.3%). Interassay coefficients of variation for insulin at 106.9 pmol/l and at 353.7 pmol/l levels were 4.8 and 6.5%, respectively. Glucose was determined by the oxidase method and lipid parameters by standard enzymatic methods. We used the homeostatic model assessment (HOMA-IR) [29] and the McAuley index (which includes insulin and triglyceride in the equation [30]) to estimate insulin resistance. Area under the curve (AUC) was calculated for insulin, glucose, triglyceride and adiponectin plasma concentrations by the trapezoid method.

Statistical Analyses

SPSS 11.5 statistical package and the SAS system 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) were used for data analysis. General Linear Model for repeated measures with Dunnett's method was used to compare mean baseline concentrations with the postprandial values in each group of subjects. One-way analysis of variance (ANOVA) with posthoc multiple comparisons using Bonferroni correction was used to compare the three groups of subjects. Spearman's correlation tests and stepwise multiple regression analyses were also used to evaluate the relationship between variables. All p values were 2-sided and a p < 0.05 was considered to be statistically significant. Results were expressed as mean ± SD.

Results

Fasting Study

Baseline characteristics of participants are shown in table 1. Lean subjects showed a lower BMI, waist circumference and % of body fat than the other two groups. IGF-I levels were lower in PWS patients than in lean subjects. Fasting glucose, cholesterol and triglyceride were not different between the three groups. Insulin concentrations and HOMA-IR index were higher and McAuley index

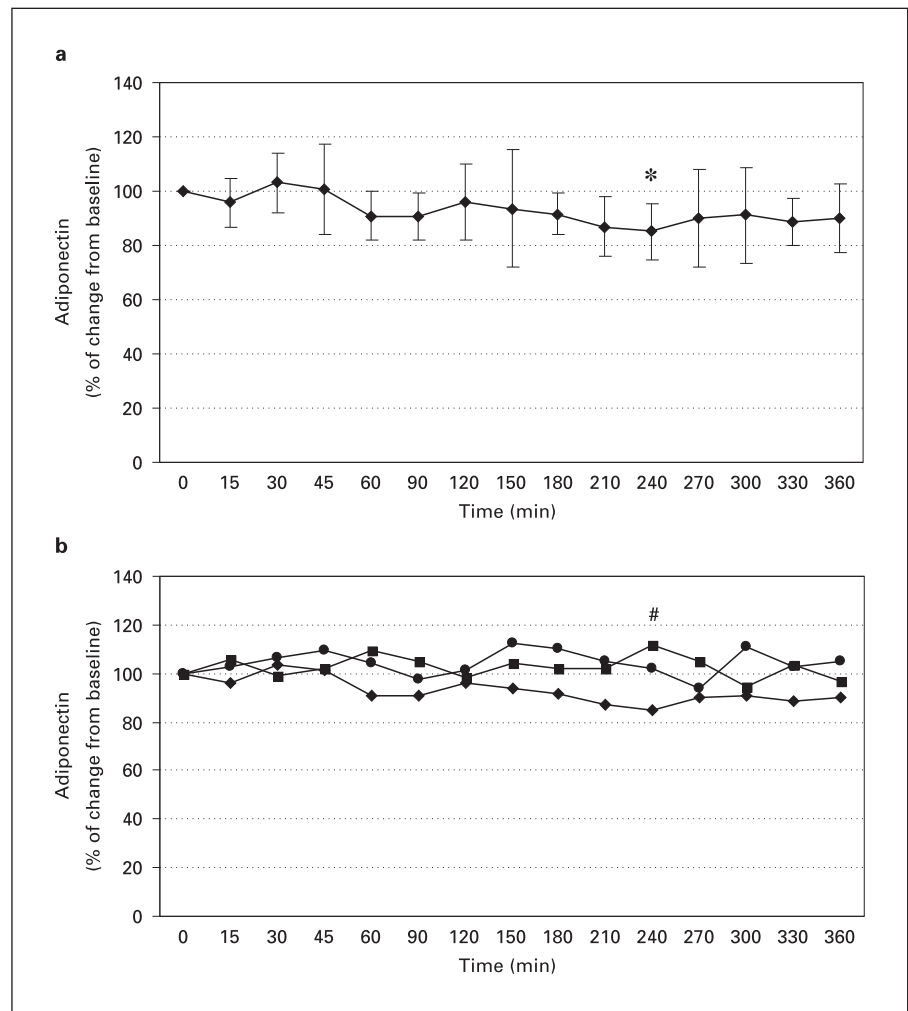


Fig. 1. Percentage of change from baseline of plasma adiponectin levels after a standard liquid meal, 3,139.5 kJ or 750 kcal in Prader-Willi syndrome patients (**a**), and all 3 groups together (**b**). General lineal model for repeated measures with Dunnett's method was used: * $p < 0.05$ vs. baseline; # $p < 0.05$ Prader-Willi syndrome patients vs. obese and lean subjects.

was lower in obese than in lean subjects. Fasting adiponectin levels were lower in PWS patients than in lean patients (5.24 ± 2.56 vs. 8.28 ± 4.63 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.041$) but higher than in obese subjects (5.24 ± 2.55 vs. 4.01 ± 1.27 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.047$). Fasting adiponectin levels were lower in obese than in lean subjects (4.01 ± 1.27 vs. 8.28 ± 4.63 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.036$) (table 1).

Postprandial Study

Baseline characteristics of participants are shown in table 2. PWS patients and the obese group were matched by age, sex, BMI, waist circumference and % fat. IGF-I levels were lower in PWS patients than in lean subjects. Fasting glucose, cholesterol, triglyceride, and insulin concentrations as well as HOMA-IR index and McAuley index were not different between the three groups. Fasting plasma adiponectin concentrations were similar in the 3

groups (PWS: 5.24 ± 2.55 , vs. obese: 5.99 ± 4.11 , vs. lean: 6.04 ± 2.28 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.456$).

Six-hour-postprandial AUC for insulin and triglycerides were higher for PWS and obese patients when compared to lean subjects, while AUC for glucose did not differ between the three groups (table 2). After the meal, adiponectin concentrations in PWS patients decreased significantly only at time point 240 min (4.52 ± 2.27 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.041$), while in obese or lean subjects no changes were observed (fig. 1). When the three groups were compared, postprandial adiponectin levels in PWS were significantly lower at time point 240 min (4.52 ± 2.27 $\mu\text{g/ml}$) as compared to obese (5.96 ± 3.60 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.034$) or lean subjects (6.66 ± 2.14 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.001$) (fig. 1). As this postprandial decrease was mild (13.8%), the 6-hour-postprandial AUC for adiponectin in PWS patients was not significantly lower (table 2).

Correlations

Considering the three groups together, fasting adiponectin correlated negatively with BMI ($r = -0.931$, $p = 0.001$), waist circumference ($r = -0.698$, $p = 0.004$) and fasting triglyceride ($r = -0.641$, $p = 0.001$) and positively with the McAuley index ($r = 0.588$, $p = 0.005$). Fasting adiponectin did not correlate with fasting IGF-I levels and Homa-IR index. In stepwise multiple regression analyses using fasting adiponectin as a dependent variable and either McAuley index or Homa-IR index and BMI, % fat and fasting triglycerides as independent ones, BMI was the only variable related to fasting adiponectin levels ($r^2 = 0.131$, $\beta = -0.361$, $p = 0.003$).

Postprandial adiponectin correlated negatively with postprandial triglyceride, insulin and glucose at different time points but when stepwise multiple regression analyses were applied, the only independent variable associated with adiponectin was triglyceride concentration ($r^2 = 0.362$, $\beta = -0.743$, $p = 0.012$, at 240').

Discussion

The present study shows that fasting plasma adiponectin levels are lower in PWS than in lean subjects but they are higher than in obese patients. It also shows that adiponectin levels mildly decrease after a standard meal only in PWS. To our knowledge, this is the first report that evaluates postprandial adiponectin levels in PWS.

The differences found in fasting adiponectin levels in the three groups are in agreement with a previous publication [31] but not with another study [32] that showed normal fasting adiponectin levels in PWS as compared to a control group. These differences seem to be related to body weight rather than to the degree of insulin resistance since in the multiple regression analysis BMI (and not HOMA index) was the only variable related to fasting adiponectin levels.

As adiponectin may stimulate thermogenesis [21], maintained low adiponectin levels due to a continuous postprandial suppression could contribute to a low thermogenesis and consequently to a low energy expenditure and weight gain in this syndrome. However, adiponectin postprandial decrease was only observed in one time point and the 6-hour-postprandial AUC for adiponectin was not significantly lower as compared to the other groups. Thus, the contribution of postprandial adiponectin levels to the pathogenesis of obesity in PWS patients is unlikely to be clinically relevant.

The absence of change in postprandial adiponectin levels in the lean control group is in agreement with other studies carried out with either a standard [17, 18, 26] or a high-fat [25] meal after 2.5 h [18], 3 h [17] or 6 h [25] postprandially. However, studies in overweight subjects remain controversial. While one study showed a decrease in adiponectin levels after two different kinds of diets (high-fat and high-carbohydrate low-fiber diet) in diabetic and nondiabetic patients at 2 and 4 h postprandially [24], another study reported no effect after 60 min of a standard breakfast [27]. The different results observed in these studies may be accounted for by the short duration of the postprandial study period, the limited number of patients or the use of different diets for the meal challenge. Moreover, English et al. [17] observed a postprandial adiponectin increase in 8 of 11 obese patients 3 h after a standard meal. Our study could not reproduce this phenomenon in more severe morbidly obese patients, although it was performed with a similar diet, during a longer period of time and with a higher frequency of sampling. This finding raises the possibility of a different behavior of postprandial adiponectin in individuals with different degrees of obesity.

In order to investigate potential mechanisms by which adiponectin could be modified postprandially, we analyzed the relationship between adiponectin and postprandial glucose, insulin and triglyceride concentrations after the meal. Although a negative correlation between glucose and adiponectin was observed at some postprandial points, glucose AUC was similar in the three groups and the decrease in adiponectin only occurred in PWS patients. Moreover, glucose was excluded in the stepwise multiple regression model and therefore did not seem to play an important role in the acute regulation of adiponectin.

Insulin at supraphysiological doses acutely decreased adiponectin concentrations both in animal and in human studies using hyperinsulinemic euglycemic clamp [33]. However, many studies found no relationship between adiponectin and physiological insulin levels after a meal [18, 24, 26]. In the present study, although postprandial insulin AUC was higher in patients with PWS than in the control group, it was similar to that of the obese subjects and adiponectin only decreased in the former. Additionally, the correlation between insulin and adiponectin was weak and insulin was excluded in the multiple regression analyses. Considering all this information together it seems unlikely that insulin may act as a suppressor of adiponectin in the postprandial state in PWS.

On the other hand, adiponectin has been suggested to be involved in lipid metabolism [34]. In this study, triglyceride levels correlated negatively with adiponectin not only at baseline (similarly to other studies [18, 35, 36]) but also during the postprandial state. Besides, triglycerides were the only variable related with adiponectin in the stepwise multiple regression analyses. Since adiponectin could stimulate lipolysis [34], we hypothesised that there was an interaction between triglyceride and adiponectin levels. However, a recent *in vivo* study failed to show any change in adiponectin levels after a short-term (7 h) infusion of NEFA [37]. Therefore, triglycerides may not be the main modulator of adiponectin in the postprandial state in PWS.

A diurnal variation effect on adiponectin levels [26, 38] is unlikely since the meal challenge was performed under the same time conditions in the three groups and the mild decrease was only observed in PWS patients. In addition, no late morning peak was appreciated in either group in accordance with other studies [18, 26].

The lower activity of the GH/IGF-I axis seen in PWS patients did not seem to influence adiponectin levels

since no correlation between fasting adiponectin and IGF-I levels was observed and an absence of change of adiponectin levels after GH replacement in this syndrome has previously been reported [31].

In summary, this study shows that fasting plasma adiponectin levels in PWS are lower than in lean subjects but higher than in obese non-PWS patients. It also shows that adiponectin levels decrease so slightly after a standard meal that a potential role of postprandial adiponectin in the pathogenesis of obesity in PWS seems unlikely. More extensive studies are needed to corroborate this finding.

Acknowledgments

We thank Imma Gallach and Blanca Macho for their expert technical assistance, the Associació Catalana de Síndrome de Prader-Willi and all the subjects and their families for kindly accepting to participate. We are also indebted to Servei d'Estadística UAB for helping in statistical analyses. This study was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS): Red de Grupos de Diabetes Mellitus (RGDM 03/212), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.

References

- Cassidy SB: Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1997;34:917-923.
- Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greensberg F: Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993;91:398-402.
- Burman P, Ritzen EM, Lindgre AC: Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: a review with special reference to GH. *Endocr Rev* 2001;22:787-799.
- Zipf WB, O'Dorisio TM, Cataland S, Sotos J: Blunted pancreatic polypeptide responses in children with obesity of Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:1264-1266.
- Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS: Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi syndrome. *Nat Med* 2002;8:643-644.
- Delparigi A, Tschöp M, Heiman MI, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, Bunt JC, Tataranni PA: High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5461-5464.
- Haqq AM, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Weigle DS, Frayo RS, LaFranchi SH, Cummings DE, Purnell JQ: Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octeotride therapy in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3573-3576.
- Höybye C, Barkeling B, Espelund U, Petersson M, Thorén M: Peptides associated with hyperphagia in adults with Prader-Willi syndrome before and during GH treatment. *Growth Horm Res* 2003;13:322-327.
- Laurance BM, Brito A, Wilkinson J: Prader-Willi syndrome after age 15 years. *Arch Dis Child* 1981;56:181-186.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-26749.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697-10703.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1930-1935.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp-30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947-953.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-2476.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102:1296-1301.
- Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y: Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96:1723-1732.
- English PJ, Coughlin SR, Hayden K, Malik IA, Wilding JPH: Plasma adiponectin increases postprandially in obese, but not in lean subjects. *Obes Res* 2003;11:839-844.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-1599.

- 19 Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79–83.
- 20 Matsubara M, Maruoka S, Katayose S: Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 2002;147:173–180.
- 21 Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS: Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 2004;10:524–529.
- 22 Schoeller DA, Lovitsky LL, Bandini LG, Dietz WW, Walczak A: Energy expenditure and body composition in Prader-Willi syndrome. *Metabolism* 1998;37:115–120.
- 23 van Mil EG, Westerterp KR, Kester AD, Curfs LM, Gerver WJ, Schrander-Stumpel CT, Saris WH: Activity related energy expenditure in children and adolescents with Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:429–434.
- 24 Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, Paolisso G, Giugliano D: Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1135–1140.
- 25 Peake PW, Kriketos AD, Denyer GS, Campbell LV, Charlesworth JA: The postprandial response of adiponectin to a high-fat meal in normal and insulin-resistant subjects. *Int J Obes* 2003;27:657–662.
- 26 Gravila A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros C: Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2838–2843.
- 27 Imbeault P, Pomerleau M, Harper ME, Doucet E: Unchanged fasting and postprandial adiponectin levels following a 4-day caloric restriction in young healthy men. *Clin Endocrinol* 2004;60:429–433.
- 28 Caixàs A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrère B: Insulin unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1902–1906.
- 29 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner R: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419.
- 30 McAuley KA, Williams KA, Mann JI, Walker RJ, Lewis-Barned NJ, Temple LA, Duncan AW: Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care* 2001;24:460–464.
- 31 Høybe C, Bruun JM, Richelsen B, Flyvbjerg A, Frystyk J: Serum adiponectin levels in adults with Prader-Willi syndrome are independent of anthropometrical parameters and do not change with GH treatment. *Eur J Endocrinol* 2004;151:457–461.
- 32 Pagano C, Marin O, Calcagno A, Schiappelli P, Pilon C, Milan G, Bertelli M, Fanin E, Andrieghetto G, Federspil G, Vettor R: Increased serum resistin in adults with Prader-Willi syndrome is related to obesity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4335–4340.
- 33 Möhling M, Wegewitz U, Osterhoff M, Isken F, Ristow M, Pfeiffer AF, Spranger J: Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm Metab Res* 2002;34:655–658.
- 34 Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF: Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad USA* 2001;98:2005–2010.
- 35 Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A: Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2395–2398.
- 36 Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:134–141.
- 37 Staiger H, Tschritter O, Kausch C, Lammers R, Stumvoll M, Haring HU: Human serum adiponectin levels are not under short-term negative control by free fatty acids in vivo. *Horm Metab Res* 2002;34:601–603.
- 38 Calvani M, Scarfone A, Granato L, Mora EV, Nanni G, Castagneto M, Greco AV, Manco M, Mingrone G: Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2004;53:939–947.

Copyright: S. Karger AG, Basel 2006. Reproduced with the permission of S. Karger AG, Basel.
Further reproduction or distribution (electronic or otherwise) is prohibited without permission
from the copyright holder.

10.3. ARTÍCULO 3: “Los sujetos adultos con Síndrome de Prader-Willi muestran una mayor inflamación de bajo grado que los sujetos obesos de iguales características antropométricas”

Aceptado para su publicación en la revista *Journal of Endocrinological Investigation* en 25 de mayo de 2007.

Adult subjects with Prader-Willi syndrome show more low-grade systemic inflammation than matched obese subjects

A. CAIXAS¹, O. GIMENEZ-PALOP¹, M. BROCH², C. VILARDELL¹, A. MEGIA², I. SIMON², G. GIMENEZ-PEREZ¹, D. MAURICIO¹, J. VENDRELL², C. RICHART² and JM. GONZALEZ-CLEMENTE¹

¹Diabetes, Endocrinology and Nutrition Department, Hospital de Sabadell, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Diabetes and Research Unit, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII. Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili. Tarragona, Spain.

Short running title: Inflammation in Prader-Willi Syndrome

Key words: cytokines, postprandial, insulin resistance, innate immunity, Prader-Willi syndrome

Corresponding author:

Assumpta Caixàs, M.D., Ph.D.

Diabetes, Endocrinology and Nutrition Department

Hospital de Sabadell

Parc Taulí s/n. 08208 Sabadell. Spain

Tel: 34 93 745 84 12. Fax: 34 93 716 0646.

e-mail: acaixas@cspt.es

Acknowledgements

We thank Imma Gallach and Blanca Macho for their expert technical assistance, the *Associació Catalana de Síndrome de Prader-Willi* and all the subjects and their families for kindly accepting to participate. We are also indebted to *Servei d'Estadística UAB* for helping in statistical analyses.

Financial support: Fondo de Investigaciones Sanitarias (RG03/212, RC03/08), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain and Institut Universitari Parc Taulí (Project number 2002037), Sabadell, Spain.

List of the abbreviations

Low-grade systemic inflammation	LGSI
Prader-Willi syndrome	PWS

Abstract

Aim: Adult subjects with Prader-Willi syndrome [PWS] may show several conditions that are associated with an activation of innate immunity such as obesity, deficient GH secretion or hypogonadism. Our aim was to study if obese adult PWS subjects show an additional low-grade systemic inflammation [LGSi] in relation to obese adult non-PWS subjects and lean healthy control subjects before and after a standardized liquid meal.

Methods: Seven obese adult PWS subjects, seven matched obese non-PWS subjects and seven lean healthy control subjects were studied for 6 hours from the administration of a standard liquid meal.

Results: Compared to non-PWS, PWS subjects showed higher plasma concentrations of CRP ($p=0.030$), C3 ($p=0.018$), IL-18 ($p=0.048$) and IL-6 ($p=0.041$) that persisted postprandially elevated for CRP ($p<0.0001$), C3 ($p=0.015$) and IL-18 ($p=0.003$). TNF- α did not differ between the three groups. These results were independent from IGF-1 levels, HOMA index, and BMI. In male subjects with PWS, testosterone levels correlated to IL-18 ($r=-0,646$, $p=0.041$).

Conclusions: Compared to matched non-PWS subjects, the obese PWS subjects in this study showed an additional LGSi that persisted postprandially and was independent from BMI, insulin resistance, and deficient GH secretion. However, in PWS males, high IL-18 levels were related to low testosterone concentrations.

Introduction

Prader-Willi syndrome [PWS] is the most common genetic cause of marked obesity in humans. It is due to the absence or lack of expression of the paternally inherited genetic material located in region 15q11-q13 (1,2). The clinical features are neonatal hypotonia, feeding difficulties, mental retardation, behavioral problems and some features that suggest hypothalamic dysfunction, including: exaggerated hyperphagia that leads to early childhood obesity, sleep disorders, deficient GH secretion, and hypogonadism (3-5). Individuals with PWS have reduced life expectancy compared to healthy control subjects due to comorbidities such as sleep apnea, hypertension, diabetes and cardiovascular problems (5, 6). In most of these comorbidities an activation of the innate immunity producing a low-grade systemic inflammation [LGSi] manifested by increased cytokine levels seems to play a pathogenic role (7-9). Thus, subjects with PWS can present several conditions that can be associated with LGSi (10,11) such as insulin resistance (although several reports found that visceral adiposity and insulin resistance in subjects with PWS is lower than expected for their level of obesity (12-14)), deficient GH secretion or hypogonadism (15-18). Only few studies have partially analyzed fasting levels of LGSi in PWS (19-21), which may be important for the development of comorbidities. We focused the study on these molecules (C3, IL-18, IL-6,CRP and TNF- α) both in fasting and in postprandial state, because eating causes a postprandial inflammatory response in healthy and obese subjects (22, 23) and we found it of interest to evaluate whether PWS subjects had the same response or not. Therefore, the aim was to study whether obese adult PWS subjects show an additional LGSi in relation to obese adult non-PWS subjects and lean healthy control subjects before and after a

standardized liquid meal.

Materials and Methods

Subjects

Seven obese adults with genetically diagnosed PWS (6 male and 1 female), age 23.0 (20.0-26.0) years, BMI 34.5 (33.3-56.5) Kg/m²) and seven age-sex-BMI matched obese adults without PWS were recruited from an Endocrinology Clinic. The genetic tests showed 6 paternal deletion in 15q11-q13 and one maternal uniparental disomy of chromosome 15. Informed consent was obtained from each (obese subjects) or their parents (PWS subjects) prior to starting the study. The matched lean control subjects were hospital staff who also signed an informed consent. All subjects were Caucasian and their weight had been stable for at least 3 months before inclusion in the study. All males with PWS were under testosterone replacement for hypogonadism (doses were always lower than required so as to avoid secondary effects), as an average, testosterone enanthate 100 mg/4 weeks was administered. Three subjects had been treated with GH until puberty. None of the subjects had any other known conditions that modify plasma inflammatory markers (e.g. acute or chronic inflammatory or infectious diseases, alcohol intake or smoking) or had received antiplatelet, antihypertensive, anti-inflammatory or lipid-lowering treatment. None of them had diabetes mellitus (American Diabetes Association criteria) (24) or clinically proven cardiovascular disease. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Methods

Subjects were admitted into the Clinic at 08:00 h after an overnight fast of at least 10 hours, two weeks after the monthly testosterone injection in males. Anthropometrical parameters were determined by a bioelectrical impedance analysis (TANITA, body composition analyzer TBF-300): weight, height and body mass index (BMI). Waist circumference was measured at the midpoint between the lower border of the rib cage and the iliac crest. Blood samples were drawn, before and 60, 120, 240 and 360 minutes after a standard liquid meal (Ensure HN®, Abbott Lab, 750 Kcal 55% carbohydrate, 30% fat, 15% protein). This meal was selected based on previous studies that reported a good glucose, insulin and triglyceride postprandial response (25, 26). All venous blood samples were collected on ice and spun at 4°C. Aliquots of Plasma and serum were stored at -70°C until processing.

Plasma TNF- α was determined by high sensitivity Tumour Necrosis Factor-Alpha Human Biotrak ELISA System (Amersham Biosciences, UK). Plasma IL-6 by high sensitivity ELISA Kit (R&D Systems, USA). IL-18 by Human IL-18 ELISA kit (MBL, Japan). CRP and serum C3 by immunonephelometry (Dade Bering, USA).

IGF-I was measured by two-site, solid-phase, chemiluminescent enzyme immunometric assay (Diagnostic Products Corp., Los Angeles CA, USA). Insulin was determined by immunochemiluminescence method (IMMULITE DPC, Los Angeles, CA). Total testosterone was determined by a commercial RIA (DPC, Los Angeles CA, USA). Glucose was determined by the oxidase method and lipid parameters by standard enzymatic methods. Intra and interassay coefficients of variation for all the determinations were less than 10%.

We used the homeostatic model assessment (HOMA-IR) to estimate insulin resistance (calculated as fasting insulin (mU/l) x fasting glucose (mmol/l) all divided by 22.5. The cut-off for insulin resistance > 2.5) (27). Six-hour-postprandial area under the curve (AUC) was calculated for insulin, triglyceride and glucose concentrations and all the pro-inflammatory cytokines by the trapezoid method. The increment of the AUC (IAUC) was calculated subtracting the area corresponding to the baseline value from the total AUC. In order to avoid confounders, all statistical analyses which involved testosterone levels were performed only with male subjects in each group.

Statistical analyses

The SPSS/PC+ statistical package 11.5 for Windows (Chicago, IL, USA) and the SAS system 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) were used for data analysis. General Lineal Model for repeated measures with Dunnet's method was used to compare mean baseline concentrations with the postprandial values in each group of subjects. Longitudinal analyses using a mixed-effects model (28) were performed to compare postprandial pro-inflammatory cytokines behavior between groups. When values were normally distributed, one-way analysis of variance (ANOVA) with posthoc multiple comparisons using Bonferroni correction was used to compare other variables between the three groups of subjects. Otherwise, a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney rank sum test with Bonferroni correction were used. To assess the relationship between variables, linear regression analyses were performed using Spearman's correlation on ranks. All p values were 2-sided and a P value < 0.05 was considered statistically significant. Results are presented as median and interquartile range.

Results

Baseline characteristics of subjects are shown in Table 1.

Fasting study

Both obese subjects with and without PWS showed similar fasting concentrations of glucose, total cholesterol, triglyceride and insulin as well as similar insulin resistance assessed by HOMA-IR than the control group. Male subjects with PWS presented significantly lower serum concentrations of total testosterone compared to lean and obese subjects. PWS subjects also presented lower IGF-I levels compared to lean subjects (Table 1).

Both obese subjects with and without PWS showed higher plasma concentrations of some inflammatory markers when were compared to lean controls (Table 1). Moreover, compared to obese non-PWS subjects, PWS subjects showed higher plasma concentrations of C3, IL-18, IL-6, and CRP, indicating an additional LGSI in PWS subjects. TNF- α did not differ between the three groups (Table 1). No differences in cytokine levels were observed between PWS patients who had been treated with GH during childhood and those who had not (data not shown).

Postprandial study

After the meal challenge, C3 persisted elevated in PWS ($p=0.015$), while in obese subjects, it initially decreased (11.5%) at 120' ($p=0.0245$) and then reached baseline values again at 240'. In lean control subjects, the postprandial changes were not significant (Figure 1a). Although IL-18 levels, persisted more elevated in PWS than in the other groups ($p=0.003$), they tended to decrease postprandially in the three groups at 120' being statistically significant only in the lean group ($p=0.046$) (Figure 1b). IL-6 did not change significantly postprandially in PWS and in the other two groups it increased at 360' (obese $p=0.012$ and lean $p=0.05$) (Figure 1c). Postprandial CRP (Figure

1d) and TNF- α (Figure 1e) were not modified in either group and CRP persisted elevated in PWS subjects in relation to the other groups ($p < 0.0001$). The AUC for glucose was similar in the three groups (Table 2). The AUC for insulin and triglycerides in PWS and obese subjects were higher than those of lean subjects. The AUC for C3 was higher in obese subjects either with or without PWS as compared to lean subjects. The AUC for IL-18 and CRP were higher in PWS subjects as compared to both obese and lean subjects. The AUC for IL-6 and TNF- α in the three groups did not differ. To avoid the influence of the baseline values on the postprandial curves, the IAUC was measured and no differences were observed between groups for any cytokine, only triglycerides and insulin showed a significant increment in PWS and obese subjects compared to lean subjects (Table 2).

Correlations

C3 correlated with BMI and waist circumference in obese subjects (BMI: $r = 0.877$, $p = 0.026$, waist: $r = 0.645$, $p = 0.032$) and lean subjects (BMI: $r = 0.895$, $p = 0.014$, waist: $r = 0.777$, $p = 0.023$), but this relationship was lost in subjects with PWS.

In PWS males, testosterone levels correlated to IL-18 ($r = -0.646$, $p = 0.041$), while the correlation to CRP approached significance ($r = -0.665$, $p = 0.05$).

Discussion

This study shows that obese adults with PWS have a higher LGSi in the fasting state that persists postprandially in relation to obese adults without PWS with a similar level of insulin resistance and plasma concentrations of IGF-I. Furthermore, this study also suggests that in PWS males elevation of IL-18 was related to low testosterone levels. So far, three other studies have partially studied fasting LGSi in PWS subjects. One supports our results (higher CRP levels in

PWS subjects than in non-PWS obese subjects) (19), another showed no differences in CRP levels between obese PWS and non-PWS subjects (20) and the third one found high CRP and IL-6 levels as compared to normal range, which decreased after GH treatment (21).

The present study is the first to evaluate postprandial LGSI in PWS subjects. They did not respond differently to the meal from obese or lean subjects and fasting levels tended to be maintained. The cytokines that were higher at fasting in both obese patients with and without PWS, (C3, IL-6) or in PWS versus obese non-PWS (IL-18, CRP), persisted higher after the meal. This fact is important since it suggests that a standard meal does not worsen the level of cytokines. Other types of diet should be tested in order to evaluate the influence of diet composition on the inflammatory response in this kind of patients (29).

A LGSI has been described in several conditions associated with insulin resistance (8, 9, 30, 31-36). Our study challenges the role of insulin resistance or obesity per se in the higher LGSI found in subjects with PWS, because, at the same degree of obesity, insulin resistance was similar in obese PWS and non-PWS subjects and in the lean control subjects. Moreover, the positive correlation seen between BMI and waist circumference with C3 in obese and healthy subjects was lost in the PWS group and TNF-alpha, a cytokine secreted by visceral adipose tissue, did not differ between groups, indicating that inflammation is less related to obesity in this syndrome. This is not surprising, as evidence suggests that PWS subjects show even lower insulin resistance than their obese non-PWS controls and a healthier metabolic profile than simply obese patients (12, 13, 37, 38). Therefore, the metabolic consequences of the increased fat in PWS may be less important than previously believed.

We found other disturbances that could play a pathogenic role in the LGSI in this syndrome. First of all, they frequently present hypogonadism that has been associated with a LGSI (17) and could account for the differences in inflammatory markers between PWS and non-PWS obese subjects. In our study, all males with PWS were treated with low parenteral testosterone doses, therefore showing significantly lower serum testosterone concentrations (at the midway between two injections) than obese non-PWS subjects. Moreover, a negative correlation between IL-18 and testosterone levels was found. Taking into account that elevated levels of IL-18 have been shown to predict cardiovascular disease (39) and to be associated with the metabolic syndrome (35) and type 2 diabetes (9), our results suggest that male patients with PWS should be treated with a full dose testosterone to reduce IL-18. Further studies are needed to corroborate this suggestion. Secondly, growth hormone deficiency has also been related to increased LGSI in both fasting and postprandial states (15, 16, 18). Regarding this deficiency, subjects with PWS in the present study had lower IGF-I levels than the lean control subjects but did not significantly differ from those in obese non-PWS subjects, and no correlation between IGF-I and any of the inflammatory markers was observed. We did not find any differences in cytokine levels between patients who had been treated with GH during childhood and those who had not. However, the relatively low number of subjects with PWS evaluated does not rule out a possible pathogenic role of low plasma IGF-I concentrations in the increased LGSI seen in PWS.

Moreover, at least another two factors that were not evaluated in the present study could account for the higher LGSI observed in subjects with PWS. First of all, subjects with PWS are at higher risk of having nocturnal breathing disorders than obese non-PWS subjects (20), and these disorders have been associated with a

LGSI (38, 40). Secondly, subjects with PWS, show a deficiency in the activation of the parasympathetic system (41). This deficiency could explain the higher level of LGSI in PWS, because parasympathetic system is now considered an anti-inflammatory system.

In summary, compared to matched non-PWS subjects, the obese PWS subjects in this study showed an additional LGSI that persisted postprandially and was independent from BMI, insulin resistance, and deficient GH secretion. However, in males with PWS, the low testosterone levels could be related to the high IL-18 concentrations. This inflammation could contribute to the pathogenesis of the comorbidities accompanying PWS subjects or be their consequence. Further studies should be undertaken to fully evaluate the causes of this higher LGSI in subjects with PWS.

References

- 1- Cassidy SB. Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1997, 34: 917-23.
- 2- Butler MG. Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnostic. *Am J Med Genet* 1990, 35: 319-32.
- 3- Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993, 91: 398-402.
- 4- Bittel DC, Butler MG. Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Exp Rev Mol Med* 2005, 7: 1-20.
- 5- Burman P, Ritzén EM, Lindgren AC. Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: a review with special reference to GH. *Endocrine Reviews* 2001, 22: 787-99.
- 6- Einfeld SL, Kavanagh SJ, Smith A, Evans EJ, Tonge BJ, Taffe J. Mortality in Prader-Willi Syndrome. *Am J Ment Retard* 2006, 3:193-8.
- 7- Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine Reviews* 2003, 24: 278-301.
- 8- Van Oostrom AJ, van Wijk JPH, Castro-Cabezas M. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: Novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs* 2004, 64 (suppl 2):19-41.
- 9-Fischer CP, Perstrup LB, Berntsen A, Eskild P, Pedersen BK. Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clin Immunol* 2005, 117: 152-60.
- 10-Cassidy SB, Devi A, Mukaida C. Aging in Prader-Willi syndrome: 22 patients over age 30 years. *Proc Greenwood Genet Center* 1994, 13: 102-3.
- 11- Lamb AS, Johnson WM. Premature coronary artery atherosclerosis in a patient with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 1987, 28: 873-80.
- 12- Goldstone AP, Thomas EL, Brynes, et al. Resting metabolic rate, plasma leptin concentrations, leptin receptor expression, and adipose tissue measured by whole-body

magnetic resonance imaging in women with Prader-Willi syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002, 75: 468-75.

13- Goldstone AP, Unmehopa UA, Thomas EL, et al. Hypothalamic neuropeptides and regulation of fat mass in Prader-Willi syndrome. In: Eiholzer U, l'Allemand D, Zipf W, eds. *Prader-Willi syndrome as a model for obesity*. Basel, Switzerland: Karger; 2003, 31-43.

14- Talebizadeh Z, Butler MG. Insulin resistance and obesity-related factors in Prader-Willi syndrome: comparison with obese subjects. *Clin Genet* 2004, 67:230-9.

15- Heald AH, Anderson SG, Ivison F, Laing I, Gibson JM, Cruickshank K. C-reactive protein and the insulin-like growth factor (IGF)-system in relation to risk of cardiovascular disease in different ethnic groups. *Atherosclerosis* 2003, 170: 79-86.

16- Kaushal K, Heald AH, Siddals K, et al. The impact of abnormalities in IGF and inflammatory systems on the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2004, 27: 2682-8.

17- Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, et al. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol* 2003, 149: 601-8.

18- Twickler TB, Dallinga-Thie GM, Visseren LJ, de Vries WR, Erkelens DW, Koppeschaar HPF. Induction of postprandial inflammatory response in adult onset growth hormone deficiency is related to plasma remnant-like particle-cholesterol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 1228-33.

19- Butler MG, Bittel DC, Kibiryeve N, Garg U. C-reactive protein levels in subjects with Prader-Willi syndrome and obesity. *Genet Med* 2006, 8: 243-8.

20- Marzullo P, Marcassa C, Campini R, et al. The impact of growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and nocturnal breathing disorders on cardiovascular features of adult patients with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 5639-46.

21- Höybye C. Inflammatory markers in adults with Prader-Willi Syndrome before and during 12 months growth hormone treatment. *Horm Res* 2006, 66: 27-32.

- 22- Gill JMR, Al-Mamari A, Ferrell WR, et al. Effects of prior moderate exercise on postprandial metabolism and vascular function in lean and centrally obese men. *J Am Col Cardiol* 2004, 44: 2375-82.
- 23- Van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 2003, 44: 576-83.
- 24- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997, 20: 1183-97.
- 25- Caixàs A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer FX, Laferrère B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 1902-6.
- 26- Caixàs A, Giménez-Palop O, Giménez-Pérez G, et al. Postprandial adiponectin levels are unlikely to contribute to the pathogenesis of obesity in Prader-Willi syndrome. *Horm Res* 2006, 65: 39-45.
- 27- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28: 412-9.
- 28- Laird N, Ware JH. Random effects model for longitudinal data. *Biometrics* 1982, 38: 963-74.
- 29- Nettleton JA, Steffen LM, Mayer-Davis EJ, et al. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2006, 83: 1369-79.
- 30- Meijssen S, van Dijk H, Verseyden C, Erkelens M, Castro Cabezas M. Delayed and exaggerated postprandial complement component 3 response in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22: 811-6.
- 31- Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, et al. Resistin, adiponectin, ghrelin leptin and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004, 12: 962-71.

- 32- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280: E745-51.
- 33- Maachi M, Piéroni L, Bruckert E, et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF- α , leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes* 2004, 28: 993-7.
- 34- Lopez-Bermejo A, Bosch M, Recasens M, et al. Potential role of interleukin-18 in liver disease associated with insulin resistance. *Obes Res* 2005, 13: 1925-31.
- 35- Hung J, McQuillan BM, Chapman CM, Thompson PL, Beilby JP. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25: 1268-73.
- 36- Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JI, Villuendas G, Sancho J, San Millan JL. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 806-11.
- 37- Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE, et al. Visceral adipose tissue and metabolic complications of obesity are reduced in Prader-Willi syndrome female adults: evidence for novel influences on body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86: 4330-8.
- 38- Chorostowska-Wynimko J, Radomska D, Plywaczewski D, et al. Disturbed angiogenic activity in sera from obstructive sleep apnea patients. *J Physiol Pharmacol* 2005, 56 (Suppl 4):71-7.
- 39- Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P, et al. PRIME Study Group. IL-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation* 2003, 108: 2453-9.
- 40- Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, et al. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172: 625-30.

41- Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat: functional implications. *J Clin Invest* 2002, 110: 1243-50.

Legend to Figure 1

Baseline and postprandial cytokine levels in PWS (●), obese (▲) and lean (■) subjects

Footnotes to Figure 1

a: [¢] $p < 0.005$ PWS vs. obese subjects, [£] $p < 0.005$ PWS vs. lean subjects, ^p $p < 0.005$ obese vs. lean subjects, ^r $p = 0.0245$ in obese subjects time 120' vs. time 0'

b: [¢] $p < 0.05$ PWS vs. obese subjects, [£] $p < 0.05$ PWS vs lean subjects, ^q $p = 0.0457$ in lean subjects time 120' vs. time 0'

c: [¢] $p < 0.05$ PWS vs. obese subjects, [£] $p < 0.05$ PWS vs. lean subjects, ^p $p < 0.05$ obese vs. lean subjects, ^s $p < 0.05$ in obese patients and in lean subjects time 360' vs. time 0'

d: [¢] $p < 0.005$ PWS vs. obese subjects, [£] $p < 0.005$ PWS vs lean subjects.

e: Non-significant differences

Table 1: Baseline characteristics of PWS and obese non-PWS subjects and the lean controls evaluated

	PWS (n=7)	Obese (n=7)	Lean (n=7)	P
Sex (M/F)	6/1	6/1	6/1	NS
Age (years)	23.0 (20.0-26.0)	26.0 (23.0-27.0)	23.0 (21.0-26.0)	NS
BMI (Kg/m²)	34.5 (33.3-56.5) [£]	43.9 (32.8-48.0) ^P	20.3 (18.9-25.1)	^{£P} 0.001
Waist (cm)	102.2 (91.0-112.5) [£]	101.3 (92.2-111.1) ^P	70.3 (66.2-81.4)	^{£P} 0.001
Body fat (%)	47.0 (33.5-47.7) [£]	42.3 (31.8-44.8) ^P	10.8 (8.80-16.5)	^{£P} 0.001
Glucose (mmol/l)	4.94 (4.61-5.94)	4.61 (4.33-5.17)	5.05 (4.39-5.72)	NS
Insulin (pmol/l)	43.0 (24.4-79.6)	45.2 (35.2-94.7)	41.6 (20.8-50.2)	NS
Homa-IR	1.45 (0.83-2.56)	1.57 (0.98-2.54)	1.34 (0.88-1.59)	NS
Cholesterol (mmol/l)	4.32 (3.02-5.40)	4.00 (3.01-5.60)	3.62 (3.21-4.01)	NS
Triglyceride (mmol/l)	0.88 (0.73-1.07)	0.91 (0.72-0.97)	0.56 (0.47-1.09))	NS
Testosterone (nmol/l)^r	5.04 (1.41-8.32) ^{£¢}	13.0 (9.17-25.3)	23.1 (19.6-28.9)	[£] 0.009 [¢] 0.035
IGF-I (nmol/l)	10.3 (7.63-12.3) [£]	15.8 (13.2-17.9)	24.9 (17.2-31.5)	[£] 0.043
C3 (mg/dl)	120.0 (97.4-135.0) ^{£¢}	110.0 (91.2-120.0) ^P	86.4 (79.4-93.1)	[£] 0.007 [¢] 0.018 ^P 0.004
IL-18 (pg/ml)	274.7 (179.7-332.1) ^{£¢}	172.3 (122.5-295.0)	196.1 (144.4-240.9)	[£] 0.044 [¢] 0.048
IL-6 (pg/ml)	2.09 (1.40-3.86) ^{£¢}	1.75 (1.09-2.68) ^P	0.61 (0.56-2.37)	[£] 0.028 [¢] 0.041 ^P 0.048
CRP (mg/l)	14.1 (8.14-26.6) ^{£¢}	3.37 (2.79-9.48)	0.65 (0.36-4.85)	[£] 0.007 [¢] 0.030
TNF (pg/ml)	0.10 (0.08-0.17)	0.13 (0.13-0.16)	0.14 (0.05-0.19)	NS

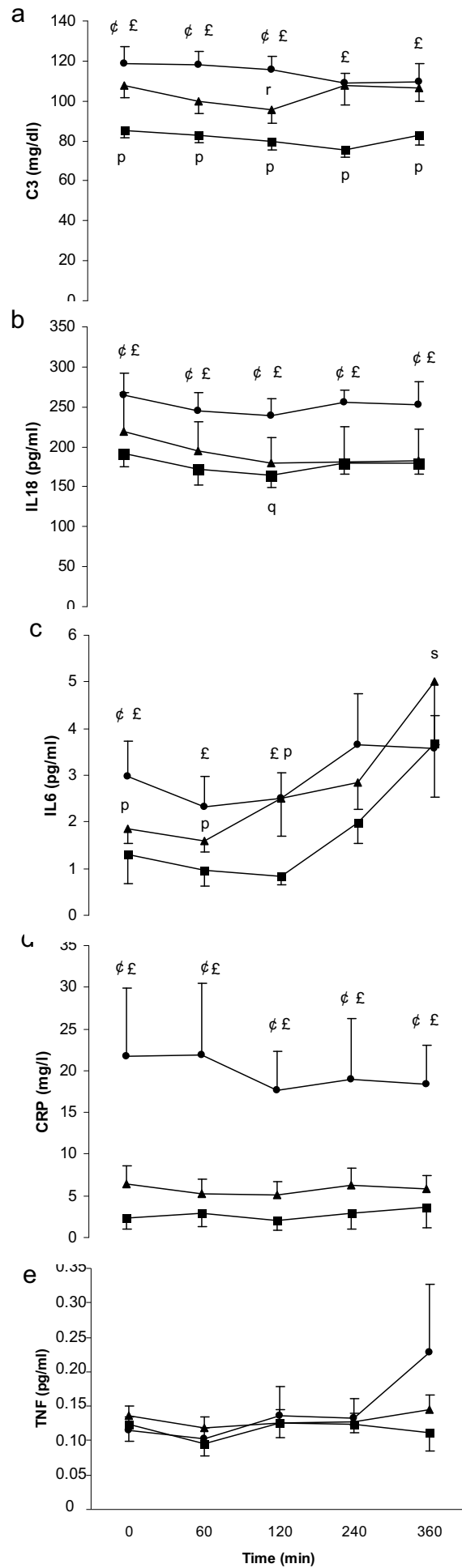
NS: Not statistically significant, ^r Excluding women, [£] PWS vs. lean subjects, ^P Obese vs. lean subjects, [¢] PWS vs. obese subjects.

Table 2: Postprandial 6-hour-AUC (AUC) (above) and Increment of 6-hour-AUC (IAUC) (below) for different variables in the three groups studied

	PWS (n=7)	Obese (n=7)	Lean (n=7)	P
Glucose (mol/lxmin)	1.89 (1.67-2.5)	1.76 (1.67-2.18)	1.79 (1.69-2.08)	NS
	0.22 (-0.09-0.38)	0.20 (0.01-0.44)	0.02 (-0.12-0.17)	NS
Insulin (nmol/lxmin)	197.2 (186.6-263.4) [£]	158.5 (127.6-296.9) ^P	93.3 (66.7-116.5)	[£] 0.043 ^P 0.045
	183.7 (142.3-258.2) [£]	124.4 (93.7-285.8) ^P	78.3 (59.2-98.4)	[£] 0.004 ^P 0.044
Triglyceride (mol/lxmin)	2.14 (1.60-2.18) [£]	1.89 (1.05-2.69) ^P	0.72 (0.49-1.15)	[£] 0.042 ^P 0.041
	1.73 (1.31-1.90) [£]	1.57 (0.90-2.23) ^P	0.50 (0.32-0.75)	[£] 0.035 ^P 0.018
C3 (g/dl x min)	45.0 (34.0-46.7) [£]	35.8 (32.1-42.1) ^P	30.4 (27.0-33.0)	[£] 0.002 ^P 0.026
	-1.11 (-7.92-0.89)	-1.74 (-4.24-(-0.72))	-1.82 (-4.08-1.70)	NS
IL-18 (ng/ml x min)	95.1 (67.6-114.5) [£] [¢]	55.4 (49.3-75.5)	60.6 (49.5-78.1)	[£] 0.026 [¢] 0.043
	-5.03 (-9.63-(-2.85))	-7.33 (-25.87-5.18)	-5.62 (-9.52-(-5.32))	NS
IL-6 (ng/ml x min)	0.74 (0.64-1.80)	0.97 (0.67-1.95)	0.58 (0.29-1.14)	NS
	0.02 (-0.15-0.26)	0.61 (0.16-1.24)	0.12 (-0.16-0.65)	NS
CRP (g/l x min)	5.95 (3.18-8.64) [£] [¢]	1.35 (0.78-3.08)	0.24 (0.18-0.25)	[£] 0.011 [¢] 0.010
	-0.03 (-0.93-0.48)	-0.06 (-0.33-0.08)	-0.01 (-0.05-0.29)	NS
TNF (pg/ml x min)	46.2 (33.6-103.4)	52.3 (37.6-57.9)	41.3 (25.5-52.8)	NS
	8.44 (2.81-38.08)	8.71 (-8.11-18.99)	-2.62 (-22.82-18.67)	NS

[£] PWS vs. lean subjects, ^P Obese vs lean subjects, [¢] PWS vs. obese subjects. NS: Not statistically significant

Figure 1



11. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Criterios mayores

1. Hipotonía cental neotal e infantil con dificultad para la succión, que mejora gradualmente con la edad
2. Problemas para la alimentación en la infancia con necesidad de técnicas especiales, y dificultad para ganar peso
3. Ganancia rápida o excesiva de peso después de los 12 meses de edad pero antes de los 6 años; obesidad central en ausencia de intervención.
4. Fenotipo facial característico con dolicocefalia en la infancia, frente estrecha, ojos almendrados, boca aparentemente pequeña con un labio superior fino, y comisura de los labios hacia abajo (se requieren 3 o más).
5. Hipogonadismo con cualquiera de las siguientes características, dependiendo de la edad:
 - a. Hipoplasia genital (niño: hipoplasia escrotal, criptorquidia, pene y/o testes pequeños para la edad (<5% percentil); niña: ausencia o hipoplasia grave de los labios menores y/o clítoris)
 - b. Maduración gonadal retrasada o incompleta con retraso de los signos puberales en ausencia de intervención después de los 16 años de edad (hombre: gónadas pequeñas, escaso vello facial y corporal, ausencia de cambio en la voz; mujer: amenorrea/oligomenorrea después de los 16 años)
6. Retraso global del desarrollo en menores de 6 años; retraso mental moderado a partir de los 6 años.
7. Hiperfagia y/o obsesión por la comida
8. Deleción 5q11-13 u otros defectos genéticos que incluyen disomía materna

Criterios menores

1. Movimientos fetales disminuidos o letargia infantil o llanto débil en la infancia, que mejora con la edad
2. Problemas característicos de comportamiento: rabietas, arranques violentos y comportamiento obsesivo-compulsivo, tendencia a discutir, disconforme, inflexible, manipulador, posesivo y terco; tenaz, ladrón y mentiroso (se requieren 5 o más de estos síntomas).
3. Alteraciones del sueño o apneas del sueño
4. Talla baja a los 15 años para su potencial genético (en ausencia de tratamiento con hormona de crecimiento)
5. Hipopigmentación (en comparación con su familia)
6. Manos y/o pies pequeños para su edad
7. Manos estrechas
8. Anomalías oculares (estrabismo, miopía)
9. Saliva espesa y viscosa con costras en las comisuras de la boca
10. Defectos en la articulación de las palabras
11. Rascarse la piel

Datos de apoyo (aumentan la certeza pero no puntúan)

1. Umbral alto al dolor
2. Escasa tendencia al vómito
3. Temperatura inestable en la infancia o sensación de temperatura alterada en niños mayores o adultos
4. Escoliosis y/o cifosis
5. Adrenarquia prematura
6. Osteoporosis

7. Habilidad inusual con los rompecabezas

8. Estudios neuromusculares normales

PUNTUACIÓN: Los criterios mayores cuentan 1 punto. Los criterios menores cuentan medio punto. Para niños de 3 años de edad o menos: se requieren 5 puntos para el diagnóstico, 4 de los cuales han de ser de criterios mayores. Para niños de más de 3 años: se requiere un total de 8 puntos, y 5 o más puntos deben ser de criterios mayores.

12. ANEXO:

“Los niveles de ghrelina circulantes en la disfunción tiroidea están relacionados con la resistencia a la insulina, y no con el hambre, la ingesta o los parámetros antropométricos”

CLINICAL STUDY

Circulating ghrelin in thyroid dysfunction is related to insulin resistance and not to hunger, food intake or anthropometric changes

Olga Giménez-Palop, Gabriel Giménez-Pérez, Dídac Mauricio, Eugenio Berlanga¹, Neus Potau², Carme Vilardell, Jaume Arroyo, José-Miguel González-Clemente and Assumpta Caixàs

Unit of Diabetes Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell and ¹Unitat de Diagnòstic per la Imatge d'Alta Tecnologia, Institut Universitari Parc Taulí, UAB c/Taulí s/n 08208 Sabadell, Spain and ²Hormonal Laboratory, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, UAB, Pte de la Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Spain

(Correspondence should be addressed to A Caixàs; Email: acaixas@cspt.es)

Abstract

Objective: Ghrelin is a gastric peptide that plays a role in appetite stimulation, energy balance and possibly in insulin resistance. Hyperthyroidism is a situation where negative energy balance and insulin resistance coexist, while in hypothyroidism a positive energy balance and normal insulin sensitivity predominate. We investigated ghrelin levels and their relationship with hunger, food intake and both anthropometric and insulin resistance parameters in patients with thyroid dysfunction.

Design and methods: We studied 24 hyperthyroid and 17 hypothyroid patients before and after normalisation of thyroid hormone levels and their respective body mass index (BMI)-matched control group. We measured plasma ghrelin levels, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, a hunger score, mean three-day calorie intake and anthropometric parameters.

Results: In hyperthyroidism, HOMA-IR index was higher (3.21 ± 0.60 vs 1.67 ± 0.15 mM mU/l; $P = 0.014$, *t* test for independent data) and ghrelin levels were lower (463.6 ± 36.4 vs 561.1 ± 32.1 pg/ml; $P = 0.041$, Mann–Whitney U-test) than in its control group and both normalised after treatment (HOMA-IR: 2.28 ± 0.38 mM mU/l; $P = 0.106$, *t* test for independent data, and ghrelin: 539.7 ± 45.4 pg/ml; $P = 0.549$, Mann–Whitney U-test). Glucose, as a component of HOMA-IR index was the only predictor for ghrelin levels ($\beta = -0.415$, $P = 0.044$, stepwise multiple regression analysis). In hypothyroidism, HOMA-IR index and ghrelin levels were similar to those in its control group both before and after treatment. In both thyroid dysfunction states, no correlations were observed between changes in ghrelin levels and in free T4, free T3, anthropometric parameters, total calorie intake and hunger score.

Conclusions: In thyroid dysfunction states, ghrelin levels seemed to be in relation to insulin resistance and not to energy balance and food intake regulation, as seen in other physiological and pathological states.

European Journal of Endocrinology 153 73–79

Introduction

Ghrelin is a novel enteric hormone that increases food intake, body weight and, growth hormone (GH) secretion as potently as any known peptide (1–6). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans (7). It has been suggested that ghrelin is one of the peripheral hormones, together with leptin, insulin and glucocorticoids, which permit the central regulation of energy balance. It is thought that these peripheral hormones exert their effects on energy homeostasis either by activating or inhibiting the activity of the orexigenic or anorexigenic peptides within the hypothalamus (8).

Ghrelin stimulates food intake through the activation of neuropeptide Y (NPY)/agouti-related protein (AGRP) producing neurons (9).

In states of positive energy balance such as obesity or the postprandial state, ghrelin concentrations are suppressed (10–12) and, conversely, they are increased (13) in negative energy balance states such as anorexia nervosa. It appears that insulin may suppress circulating ghrelin levels (14–16) and that there is an inverse association between ghrelin and insulin resistance (17, 18).

Thyroid dysfunction is associated with changes in body weight, food intake and energy expenditure. Hyperthyroid patients usually experience a decrease

in body weight in spite of hyperphagia and thyroid hormone excess induces appreciable insulin resistance, while hypothyroidism is associated with weight increase and normal insulin sensitivity (19–22).

Data about ghrelin levels in human thyroid dysfunction are limited. To date, only one study has been performed in a small number of patients with hyperthyroidism, which reported suppressed circulating ghrelin levels despite being in a negative energy balance state (23). In this study food intake was not evaluated. On the other hand there is no information available on hypothyroid patients. Therefore, to elucidate the potential role of ghrelin in the regulation of food intake and energy balance during thyroid dysfunction, we have evaluated fasting plasma ghrelin levels in both hyper and hypothyroidism before and after normalisation of thyroid function and its relationship with hunger, caloric intake, and both anthropometric and insulin resistance parameters.

Subjects and methods

The study was performed in 41 patients with thyroid dysfunction recruited from the outpatient clinic of the Diabetes, Endocrinology and Nutrition Unit (Institut Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain). Forty-five euthyroid subjects served as the control group. The diagnosis of hyperthyroidism or hypothyroidism was based on clinical assessment and biochemical findings (free T4 (FT4), free T3 (FT3), and thyrotropin (TSH)).

The hyperthyroid group consisted of 24 patients (19 women and five men, mean age 42.7 ± 2.7 years). The aetiology of the hyperthyroidism was Graves' disease ($n = 23$) and toxic multinodular goitre ($n = 1$). The hypothyroid group consisted of 17 women (mean age 46.9 ± 3.7 years) and the aetiology of the hypothyroidism was chronic autoimmune thyroiditis ($n = 6$), radioiodine therapy ($n = 6$), withdrawal of thyroid hormone therapy before a total body scan for papillary thyroid carcinoma ($n = 3$), non-autoimmune hypothyroidism ($n = 1$) and postpartum thyroiditis ($n = 1$).

The control group consisted of 45 euthyroid subjects, of which 25 (21 women and four men, mean age 40.2 ± 2.4 years) matched for body mass index (BMI) served as control group for hyperthyroidism, and 20 women (mean age 43.7 ± 3.2 years) also matched for BMI served for hypothyroid patients.

Patients were evaluated at the time of diagnosis and after normalisation of thyroid function (at least normal FT4 for hyperthyroidism and both normal FT4 and TSH for hypothyroidism) with appropriate medical therapy. Hyperthyroid patients were treated with metimazol. L-thyroxine was prescribed to hypothyroid patients to establish biochemical euthyroidism. Healthy subjects were tested once. All participants were admitted to the Endocrine Unit (Institut Universitari Parc Taulí) in

the morning between 0800 h and 0900 h after a 12 h overnight fast. We performed a complete physical examination, including the measure of the waist-to-hip ratio and body composition by bioelectrical impedanciometry after emptying the urine bladder. Blood samples were obtained to measure serum concentrations FT4, FT3, TSH and plasma ghrelin concentrations. Thyroid peroxidase autoantibodies (TPOAbs), thyroid-stimulating immunoglobulins and other laboratory and complementary investigations were carried out in patients with thyroid dysfunction as part of the diagnostic work-up. Participants with thyroid dysfunction were asked to record their food intake over a period of 3 days in the week following the study (one at the weekend and two on consecutive working days) and hunger was evaluated using 100-mm visual analog scale preceded by the question 'Do you feel hungry?'. The scale was anchored with 'not at all' and 'extremely' at the left and right ends, respectively. The distance from the extreme left to the subject's vertical dash represented the rating score, expressed in mm as previously described (24). All the subjects were interviewed by a dietician about their food intake. Macronutrient composition and daily calorie intake were calculated with the use of food composition tables (Diet Source 2.0, Novartis Consumer Health, S.A. Barcelona, 1977–2003, www.novartismedical.nutrition.com.es).

Body composition was measured by bioelectric impedanciometry (body composition analyzer TBF-300, TANITA, Tokyo, Japan).

The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated using fasting insulin and glucose concentrations as previously described (25).

Blood samples were processed immediately and the plasma and serum was stored at -80°C until assayed. Human plasma ghrelin was measured with a commercially available RIA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA, USA) which measures total circulating ghrelin concentrations. The intra- and interassay coefficients of variation were 6.2% and 9.0% respectively. TSH, FT4 and FT3 were measured by commercially available electrochemiluminescence immunoassays (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Interassay coefficients of variation were 8.7% at $0.034 \mu\text{U/ml}$ and 3.6% at $3.96 \mu\text{U/ml}$ for TSH; 3.5% at 0.68 ng/dl and 3.3% at 3.95 ng/dl for FT4 and 2.8% at 1.86 pg/ml and 2.7% at 12.7 pg/ml for FT3.

Insulin was determined by an immunochemiluminescence method (IMMULITE DPC, Los Angeles, CA, USA). The antiserum is specific for insulin with a low cross-reactivity for proinsulin (13.3%). Interassay coefficients of variation at $14.9 \mu\text{U/ml}$ and $49.3 \mu\text{U/ml}$ levels were 4.8% and 6.5% respectively. Glucose was determined by the oxidase method.

The local Ethics Committee approved the study protocol and all subjects gave written informed consent.

Statistical analysis

Data are shown as the means \pm S.E.M. Kolmogorov–Smirnov test was used to test data for normal distribution. When the variables did not normally distribute, Mann–Whitney U-test was used for comparison of data between groups and Wilcoxon signed-rank test was used to compare data before and after treatment. For normally distributed data, *t* tests for independent or paired data were used for the same purposes. Correlations between variables were assessed using Spearman's correlation analysis. Stepwise multiple regression analysis was also performed to find which variables predicted ghrelin levels. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All calculations were carried out using SPSS 11.5 for Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

Results

Body composition and anthropometric measures

At baseline, patients and their respective control groups were comparable by age, waist-to-hip ratio, BMI and % of body fat (Tables 1 and 2).

After therapy, hyperthyroid patients gained an average of 1.9 kg of body weight with a significant increase in BMI, fat mass and waist-to-hip ratio (Table 1). Hypothyroid patients showed a significant decrease in weight with an average of 2 kg and a decrease in BMI without changes in % of body fat or waist-to-hip ratio (Table 2).

Thyroid function

The hyperthyroid group showed inhibited serum TSH concentrations and high serum levels of FT4 and/or FT3; while the hypothyroid group showed elevated serum TSH concentrations with low levels of FT4 which normalised after therapy (Tables 1 and 2). The

mean time required to normalise thyroid function was 5.56 ± 0.72 months for hyperthyroid patients and 7.70 ± 0.66 months for hypothyroid patients.

Glucose and insulin concentrations and HOMA-IR:

Hyperthyroid patients showed higher fasting glucose and insulin levels and higher HOMA-IR than their controls. After normalisation of thyroid hormone levels, glucose and HOMA-IR decreased to the normal range (90.2 ± 3.2 mg/dL vs 82.9 ± 1.8 mg/dL, $P = 0.06$ and 2.28 ± 0.38 mM mU/l vs 1.67 ± 0.15 mM mU/l, $P = 0.106$ respectively); however, no changes in insulin concentrations were observed (Table 1).

Hypothyroid patients did not show differences in fasting glucose, insulin or HOMA-IR compared with their control group, but there was a mild increase of insulin levels after therapy without changes in glucose or HOMA-IR (Table 2).

Three day food-intake record and hunger score

Hyperthyroid patients showed a greater food intake before treatment than controls (2537.4 ± 165.5 vs 1972.8 ± 115.3 kcal; $P = 0.021$) without differences in the percentage of carbohydrates, proteins or lipids (39.9%, 15.7% and 44.4% vs 40.3%, 14.8% and 44.9% respectively) and a significant decrease in food intake after treatment (2234.7 ± 116.7 kcal; $P = 0.026$) also without differences in the percentage of carbohydrates, proteins or lipids (40.8%, 15.1% and 44.1%). Before treatment, hypothyroid patients showed no differences in food intake (1781.9 ± 106.8 vs 1988.4 ± 102.4 kcal; $P = 0.57$) or in the proportion of macronutrients (40.2%, 16.9% and 42.9% vs 39.8%, 15.6% and 44.6%) as compared to the control group. After treatment, no changes were observed in both parameters (1901.9 ± 116.0 kcal, $P = 0.48$; 41.6%, 16.0% and 42.4%).

Table 1 Anthropometric and biochemical characteristics of hyperthyroid patients before and after treatment, and their control group.

	Patients with hyperthyroidism (<i>n</i> = 24)		Hyperthyroid control group (<i>n</i> = 25)
	Before therapy	After therapy	
BMI (kg/m ²)	26.1 \pm 1.2	26.7 \pm 1.2 ^a	26.0 \pm 0.9
WHR	0.80 \pm 0.01	0.83 \pm 0.01 ^a	0.81 \pm 0.01
% body fat mass	30.9 \pm 1.6	32.2 \pm 1.6 ^b	31.2 \pm 1.8
Glucose (mg/dl)	96.3 \pm 3.8 ^d	90.2 \pm 3.2 ^a	82.9 \pm 1.8
Insulin (μ U/ml)	12.8 \pm 2.0 ^c	12.2 \pm 1.5 ^c	8.0 \pm 0.6
HOMA-IR index	3.21 \pm 0.60 ^c	2.28 \pm 0.38 ^a	1.67 \pm 0.15
TSH (μ U/ml)	0.01 \pm 0.00 ^d	1.54 \pm 0.34 ^b	2.35 \pm 0.16
FT4 (ng/dl)	3.24 \pm 0.33 ^d	1.07 \pm 0.04 ^b	1.18 \pm 0.03
FT3 (pg/ml)	15.5 \pm 2.24 ^d	4.79 \pm 0.26 ^b	5.16 \pm 0.12
Ghrelin (pg/ml)	463.6 \pm 36.4 ^c	539.7 \pm 45.4 ^a	561.1 \pm 32.1

Values are means \pm S.E.M. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$, before vs after therapy; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.001$, patients vs control group. BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance index (mM mU/l); WHR, waist-to-hip ratio.

Table 2 Anthropometric and biochemical characteristics of hypothyroid patients before and after treatment, and their control group.

	Patients with hypothyroidism (<i>n</i> = 17)		Hypothyroid control group (<i>n</i> = 20)
	Before therapy	After therapy	
BMI (kg/m ²)	28.5±1.0 ^a	27.7±1.1	27.2±1.2
WHR	0.83±0.01	0.84±0.01 ^c	0.79±0.01
% body fat mass	37.9±1.3	37.6±1.2	35.7±1.5
Glucose (mg/dl)	86.6±2.7	85.6±1.4	86.0±2.1
Insulin (μU/ml)	11.3±1.4 ^a	13.5±1.1 ^c	9.9±1.1
HOMA-IR index	2.46±0.31	2.73±0.31	2.15±0.29
TSH (μU/ml)	119.0±20.6 ^d	2.10±0.19 ^b	1.84±0.23
FT4 (ng/dl)	0.24±0.06 ^d	1.29±0.07 ^b	1.18±0.03
FT3 (pg/ml)	1.88±0.28 ^d	4.32±0.22 ^b	4.78±0.17
Ghrelin (pg/ml)	561.6±49.9	590.2±35.0	593.8±55.1

Values are means±S.E.M. ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.001, before vs after therapy; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.001, patients vs control group. BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance index (mM mU/l); WHR, waist-to-hip ratio.

At baseline, hyperthyroid and hypothyroid patients presented the same hunger score as their respective control group (5.33±0.46 vs 5.64±0.44, *P* = 0.53 and 4.82±0.49 vs 5.41±0.63, *P* = 0.94), and remained unchanged after treatment, in both hyperthyroid (5.18±0.35, *P* = 0.69) and hypothyroid (5.56±0.36, *P* = 0.15) patients.

Ghrelin concentrations

In hyperthyroid patients, fasting ghrelin levels were significantly lower than in their control group (463.6±36.4 vs 561.1±32.1 pg/ml; *P* = 0.041). After normalisation of thyroid hormones, ghrelin concentrations increased up to the normal range (539.7±45.4 pg/ml; *P* = 0.549) in spite of the increase in BMI, waist-to-hip ratio and % of body fat described above (Fig. 1A). In patients with hypothyroidism, ghrelin levels were similar to those of their control group both before (561.6±49.9 vs 593.8±55.1 pg/ml; *P* = 0.672) and after (590.2±35.0 pg/ml; *P* = 0.958) treatment although BMI decreased (Fig. 1B).

Correlations

In hyperthyroidism, before treatment, ghrelin correlated negatively with BMI (*r* = -0.520, *P* = 0.009), insulin (*r* = -0.410, *P* = 0.046) (Fig. 2A) and glucose (*r* = -0.515, *P* = 0.01) (Fig. 2B) concentrations and the HOMA-IR index (*r* = -0.462, *P* = 0.023). No correlations were observed between ghrelin and the percentage of body fat, waist-to-hip ratio, TSH, FT4 and FT3. Although ghrelin correlated negatively with the hunger score (*r* = -0.476, *P* = 0.029) (Fig. 2C), no association between ghrelin and calorie intake or the percentage of macronutrients was observed. Using a stepwise multiple regression analysis with ghrelin as the dependent variable and BMI, insulin, glucose, FT3 and FT4 as the independent ones, only glucose entered into the model (β = -0.415, *P* = 0.044). The percen-

tage of variation of ghrelin after treatment did not correlate with the percentage of variation of any independent variable.

In hypothyroidism, no correlations were observed between ghrelin and any of the variables mentioned either before or after treatment.

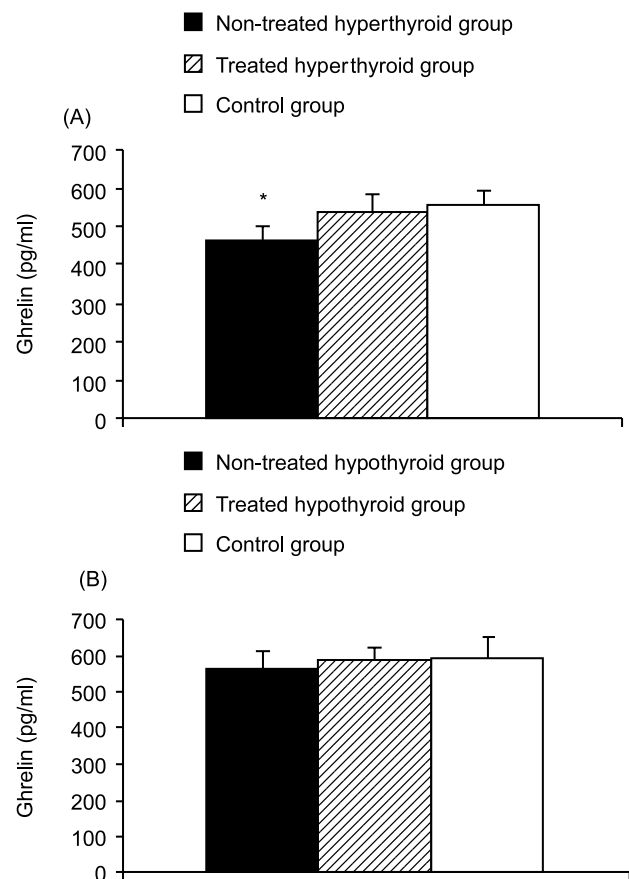


Figure 1 Plasma ghrelin levels in hyperthyroid (A) and hypothyroid patients (B) before and after normalisation of thyroid hormone levels and their respective control groups. **P* < 0.05 vs treated hyperthyroid group and control group.

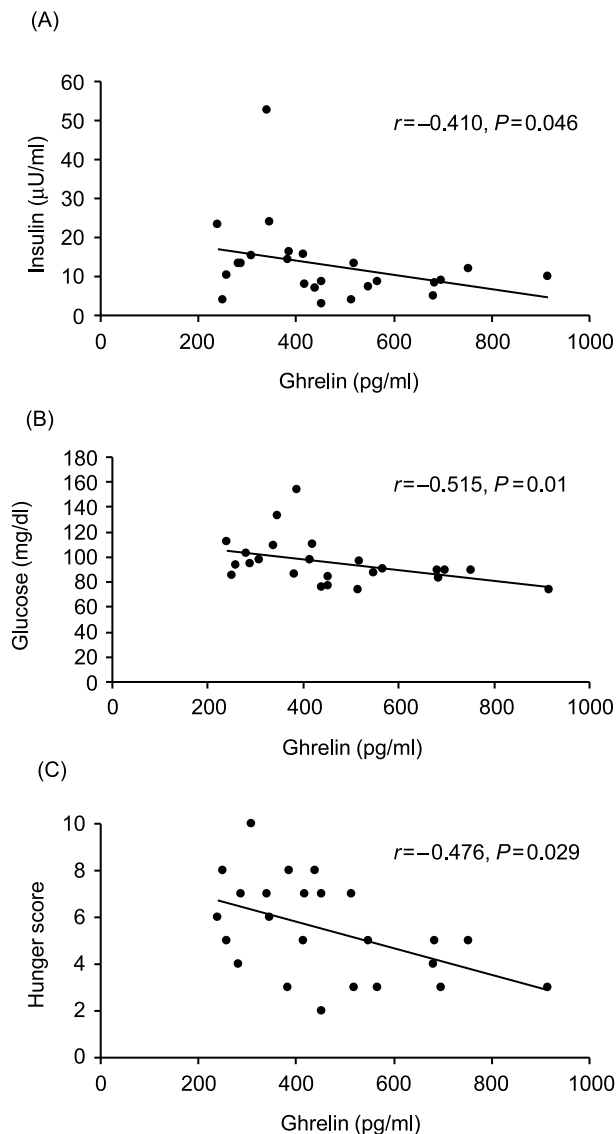


Figure 2 Correlations between plasma ghrelin levels and fasting insulin (A), fasting glucose (B) and hunger score (C) in hyperthyroid patients before treatment.

In the control group, only insulin levels ($r = -0.347$, $P = 0.017$) and HOMA-IR index ($r = -0.354$, $P = 0.020$) correlated negatively with ghrelin concentrations.

Discussion

The present study evaluates the relationship between plasma ghrelin levels and hunger, food intake, anthropometric changes and insulin resistance in thyroid dysfunction states.

Hyperthyroidism is characterized by extensive weight loss despite normal or increased calorie intake. Weight loss reflects not only a depletion of body adipose tissue

stores but also a loss of muscle mass caused by accelerated catabolism accompanied by increased oxygen consumption and heat elimination (26). As in other negative balance states (27), we expected that ghrelin concentrations would be high in hyperthyroidism as a response aimed to restore energy balance. However, consistently with a previous study in nine patients with hyperthyroidism (23) and another in rats (28), we found that plasma ghrelin levels were low and that they normalised after therapy. We hypothesise that the low ghrelin concentrations found in patients with hyperthyroidism could be explained, partly, by the high insulin levels and the elevated insulin resistance observed in this thyroid situation (19–21). Although some authors reported that the administration of insulin and glucose did not suppress ghrelin levels (12, 29), other studies stated that insulin may negatively regulate ghrelin concentrations. In agreement with our results, they also showed a negative correlation between ghrelin and insulin levels or insulin resistance (17, 18, 30, 31). Thus, the compensatory hyperinsulinemia associated with insulin resistance observed in the hyperthyroid group could contribute to the decreased ghrelin concentrations. However, after treatment, insulin sensitivity improved mainly due to a decrease in glucose levels while insulin concentrations remained unchanged. Furthermore, after a stepwise multiple regression analysis, glucose was the only variable that entered into the model to predict ghrelin levels. Therefore, a role of glucose in ghrelin suppression in hyperthyroidism needs to be considered. On the other hand, it is well-known that hyperthyroidism is associated with increased activity of the sympathetic nervous system and with abnormalities of GH/IGF-I axis (32, 33) which although they were not evaluated in this study may influence glucose homeostasis and insulin sensitivity and therefore, ghrelin levels. We cannot rule out the possibility of an increased metabolic clearance rate effect, similar to what has been shown with other hormones such as prolactin or growth hormone that show a decrease in their serum concentrations in hyperthyroid patients despite increased production rates (34–38). However, if this were the case, the opposite would be expected in hypothyroidism where ghrelin levels were similar to healthy controls before and after treatment. Furthermore, glucose and insulin concentrations and insulin sensitivity were normal in hypothyroidism, as previously described (23). This observation could contribute to explain why ghrelin levels were not altered in hypothyroidism. To our knowledge, this is the first report of ghrelin levels in human hypothyroidism. There is only one study in hypothyroid rats in which, in contrast to our findings, ghrelin m-RNA expression in the stomach and circulating plasma ghrelin were increased (28).

Ghrelin levels are modified along with changes in body weight. In this sense, ghrelin levels increase in obese patients after diet induced weight loss (39, 40) and decrease in anorexia nervosa after weight gain

(27). In the present study, ghrelin levels increased in hyperthyroidism after treatment, in spite of an increase in BMI, waist-to-hip ratio and percentage of body fat and, in hypothyroidism, BMI decreased without modification of ghrelin levels suggesting an absence of relationship between ghrelin and these anthropometric changes in thyroid dysfunction. Additionally, we did not find any correlation between ghrelin and thyroid hormone levels as previously described (23).

Hyperphagia is considered an important feature of hyperthyroidism and an alteration of the neurophysiology of food intake regulation has been suggested in Graves' disease (41). In our study, food intake of hyperthyroid patients decreased after treatment with no relation to ghrelin levels. In addition, a negative correlation between plasma ghrelin concentrations and the hunger score was observed, in contrast to previous studies in healthy subjects (24). These findings would imply that the higher the ghrelin levels are the lower the appetite sensation is, which is not in accordance with the supposed role of ghrelin as an appetite stimulator as seen in other situations (3, 5, 6, 24). Furthermore, ghrelin expression in stomach of hyperthyroid rats is low despite being markedly hyperphagic (42). All this information taken together it seems unlikely that ghrelin is the primary stimulator of appetite and food intake in hyperthyroidism. In hypothyroid patients food intake did not change after treatment and the hunger score did not correlate with ghrelin levels.

It has recently been shown that total ghrelin levels detected by using the commercially available Phoenix assay mostly reflect des-acyl ghrelin (43), which is devoid of orexigenic effects. Besides, the acylated ghrelin, which harbours the orexigenic effects, binds to some other particles in plasma such as HDL (44), which can be altered in situations of thyroid dysfunction. Thus, taking these two considerations together, it is possible that the detection of acylated ghrelin would have been more accurate to evaluate the relationship between this hormone and food intake in thyroid dysfunction.

In conclusion, ghrelin levels were decreased in hyperthyroidism and they seemed to be modulated by the state of insulin resistance. After treatment, ghrelin levels were restored along with insulin sensitivity. In hypothyroidism, ghrelin levels and insulin sensitivity were not altered neither before nor after treatment. In both thyroid dysfunctions, ghrelin levels were not related to hunger, food intake or changes in BMI, waist-to-hip ratio or the percentage of body fat. Therefore, in thyroid dysfunction states, a role for ghrelin in energy balance regulation as seen in other physiological and pathological situations was not stated.

Acknowledgements

We thank Anna Méndez, Antonia Humanes and Blanca Macho for their expert technical assistance.

This study was partially supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS): Red de Grupos de Diabetes Mellitus (RGDM 03/212), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo and by a grant from Institut Universitari Parc Taulí, UAB (Project Number 2003123, CEIC).

References

- 1 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H & Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 **402** 656–660.
- 2 Tschöp M, Smiley DL & Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000 **407** 908–913.
- 3 Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K & Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001 **409** 194–198.
- 4 Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F & Ghigo E. Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigations* 2000 **23** 493–495.
- 5 Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal le IJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri RL, Stanley SA, Ghatei MA & Bloom SR. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001 **50** 2540–2547.
- 6 Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA & Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 5992–5996.
- 7 Cummings D, Purnell J, Frayo R, Schmidova K, Wisse B & Weigle D. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001 **50** 1–6.
- 8 Sainsbury A, Cooney G & Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **16** 623–637.
- 9 Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K & Nakao K. Ghrelin an endogenous growth hormone secretagogue is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001 **50** 227–232.
- 10 Tschöp M, Wawarta R, Riepl R, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R & Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigations* 2001 **24** RC19–RC21.
- 11 Tschöp M, Weyer C, Tataranni A, Devanarayan V, Ravussin E & Heiman M. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001 **50** 707–709.
- 12 Caixàs A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer FX & Laferrère B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 1902–1906.
- 13 Nedvídková J, Krykorková I, Barták V, Papezová H, Gold P, Alesci S & Pacak K. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 1678–1682.
- 14 Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV & Sherwin RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism* 2003 **284** E313–E316.
- 15 Saad ME, Bernaba B, Hwu C, Jinagouda S, Fahmi S, Kosogov E & Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 3997–4000.
- 16 Purnell JQ, Weigle DS, Breen P & Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status,

- or cortisol levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 5747–5752.
- 17 Mc Laughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS & Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistance obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 1630–1635.
 - 18 Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, Kondo C, Kojima M, Kangawa K & Sugihara S. Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* 2002 **51** 3408–3411.
 - 19 Kreines K, Jett M & Knowles HC. Observation in hyperthyroidism of abnormal glucose tolerance and other traits related to diabetes mellitus. *Diabetes* 1965 **14** 740–744.
 - 20 Dimitriadis G, Baker B, Marsh H, Mandarino L, Rizza R, Bergman R, Haymond M & Gerich J. Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans. *American Journal of Physiology* 1985 **248** E593–E601.
 - 21 O'Meara NM, Blackman JD, Sturis J & Polonsky KS. Alterations in the kinetics of C-peptide and insulin secretion in hyperthyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993 **76** 79–84.
 - 22 Loeb JN. Metabolic changes in thyrotoxicosis. In *Werner's the thyroid*, edn 7, ch 73, pp 858–863. Eds SH Ingbar & LE Braveman. Philadelphia: Lippincott, 1996.
 - 23 Riis ALD, Hansen TK, Moller N, Weeke J & Jorgensen JOL. Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 853–857.
 - 24 Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R & Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores among humans initiating meals voluntarily in the absence of time- and food-related cues. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2004 **287** E297–E304.
 - 25 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985 **28** 412–419.
 - 26 Loeb JN. Metabolic changes in thyrotoxicosis. In *Werner's the thyroid*, edn 7, ch 49, pp 687–693. Eds SH Ingbar & LE Braveman. Philadelphia: Lippincott, 1996.
 - 27 Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman M, Lehnert P, Fichter M & Tschöp M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology* 2001 **145** R5–R9.
 - 28 Caminos JE, Seoane LM, Tovar SA, Casabueva FF & Dieguez C. Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. *European Journal of Endocrinology* 2002 **147** 159–163.
 - 29 Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuck W, Woltz M & Luger A. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 2003 **52** 16–20.
 - 30 Schoff C, Horn R, Schill T, Schlosser HW, Muller MJ & Brabant G. Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 4607–4610.
 - 31 Haqq AM, Farooqi S, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfield RG, Pratt KL, La Franchi SH & Purnell JQ. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 174–178.
 - 32 Loeb JN. Catecholamines and the sympathoadrenal system in thyrotoxicosis. In *Werner's the thyroid*, edn 7, ch 46, pp 661–670. Eds SH Ingbar & LE Braveman. Philadelphia: Lippincott, 1996.
 - 33 Loeb JN. The pituitary in thyrotoxicosis. In *Werner's the thyroid*, edn 7, ch 44, pp 653–655. Eds SH Ingbar & LE Braveman. Philadelphia: Lippincott, 1996.
 - 34 Taylor AL, Finster JL & Mintz DH. Metabolic clearance and production rates of human growth hormone. *Journal of Clinical Investigation* 1969 **48** 2349–2358.
 - 35 Iranmanesh A, Lizarralde G, Johnson ML & Veldhuis JD. Nature of altered growth hormone secretion in hyperthyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991 **72** 108–115.
 - 36 Cooper DS, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN & Maloof F. Metabolic clearance and production rates of prolactin in man. *Journal of Clinical Investigation* 1979 **64** 1669–1680.
 - 37 Snyder PJ, Jacobs LS, Utiger RD & Daughaday WH. Thyroid hormone inhibition of the prolactin response to thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Clinical Investigation* 1973 **52** 2324–2329.
 - 38 Ciccarelli E, Zini M, Grottoli S, Razzore P, Portioli I & Valcavi R. Impaired prolactin response to arginine in patients with hyperthyroidism. *Clinical Endocrinology* 1994 **41** 371–374.
 - 39 Cummings D, Weigle D, Frayo R, Breen P, Ma M, Dellinger E & Purnell J. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine* 2002 **346** 1623–1632.
 - 40 Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS & Jorgensen JO. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clinical Endocrinology* 2002 **56** 203–206.
 - 41 Pijl H, de Meijer P, Langius J, Coenegracht C, Berk A, Shaw P, Boom H, Schoemaker R, Cohen A, Burggraaf J & Meinders A. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 5848–5853.
 - 42 Ishii S, Kanegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H & Oikawa S. Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology* 2003 **78** 321–330.
 - 43 Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, Ghatgei MA & Bloom SR. Characterisation of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 2205–2211.
 - 44 Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP & Srai KS. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *Journal of Biological Chemistry* 2003 **278** 8877–8880.

Received 10 January 2005

Accepted 22 March 2005