

DIMORFISMO SESSUALE NEI LIVELLI EMATICI DI LEPTINA DEL CANE

ROBERTA SALERI¹, MARTINA TIRELLI¹, FRANCESCA GRASSELLI¹,
MAURIZIO DONDI², MASSIMO ARISI³

¹ Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Sezione di Fisiologia Veterinaria

² Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Clinica Medica Veterinaria - Via del Taglio, 8 - I-43100 Parma

³ DVM, Ambulatorio Veterinario, Via Luzzago 12, I - 25100 Brescia

Riassunto

La leptina è coinvolta nel controllo dell'assunzione del cibo e del consumo dell'energia; recentemente è stato dimostrato che interviene anche nella regolazione di diversi assi neuroendocrini, modulando la secrezione di ormoni ipofisari. I livelli plasmatici della leptina risultano correlati a percentuale di grasso, concentrazione di glucosio e di ormoni quali GH e steroidi sessuali. Molti studi evidenziano un coinvolgimento della leptina nella riproduzione della femmina. I dati disponibili nella specie canina sono scarsi: la leptina è stata identificata e clonata di recente e nostri studi indicano una secrezione pulsatile. In questo lavoro abbiamo valutato i livelli di ormone nei due sessi ed eventuali correlazioni con GH e stato riproduttivo. I risultati indicano variabilità sessuale nei livelli ematici di leptina che appaiono più elevati nelle femmine; sono inoltre evidenti fluttuazioni dell'ormone in relazione alla fase del ciclo estrale. Questi dati suggeriscono un coinvolgimento della leptina nella modulazione della riproduzione della cagna.

Summary

Leptin has been implicated in regulation of food intake and energy expenditure. More recently, leptin has been shown to control several neuroendocrine axes by pituitary hormones. Hormone plasma levels appear to be related to body fat percentage, glucose blood concentration and hormones as GH and sexual steroids. Many reports recognize a possible role of leptin in modulating female reproduction. Scarce data are available in the dog: leptin was identified and cloned in the last years and our previous studies indicate a pulsatile secretion. In this study we investigated leptin pattern in male and female dogs as well as its possible correlation with GH and reproductive status. Results show a sexual variability of leptin, which appears significantly higher in bitches than in males; we observed significant fluctuations in hormone levels related to estrous cycle phases. These preliminary data may suggest an involvement of leptin in regulating female dog reproduction.

INTRODUZIONE

La leptina, scoperta nel 1994 da Zhang e coll.¹, è considerata uno dei principali segnali periferici che regolano l'assunzione di cibo ed il peso corporeo. È un peptide costituito da 167 aminoacidi con una sequenza-segnale amino-terminale costituita da 21 aminoacidi che viene persa con la traslocazione della molecola all'interno dei microsomi. La molecola presente in circolo è quindi formata da 146 aminoacidi, con un peso fra 14 e 16 kDa; la sua struttura cristallina evidenzia la presenza di un complesso formato da quattro eliche che ricorda quello tipico delle cito-

chine². In tutte le specie in cui è stata fino ad oggi studiata (uomo, ratto, topo e suino) questa molecola risulta altamente conservata, con un'omologia superiore all'80%³. Il gene *ob* che codifica per la leptina è localizzato, nella specie umana, sul cromosoma 7q31.3 e risulta costituito da tre esoni e due introni: la sua trascrizione e traslazione avvengono principalmente nel tessuto adiposo⁴ (in massima parte in quello bianco), nella placenta⁵ e, in misura molto minore, nel tratto gastrointestinale⁶. In condizioni fisiologiche la quantità di leptina prodotta è direttamente correlata sia alla massa di tessuto adiposo che alla quantità di RNA messaggero (mRNA) in esso presente; è inoltre noto che la sua produzione è doppia nella femmina rispetto al maschio⁷ e risulta influenzata sia dall'accrescimento che dal consumo energetico. Nell'uomo la leptina è secreta con ritmo circadiano (secrezione massima fra mezzanotte e

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 9/6/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 23/6/2003”.

recenti studi evidenziano insistentemente l'influenza della leptina sulla secrezione del GH sia a livello ipotalamico (regolazione dell'espressione della somatostatina), sia direttamente a livello ipofisario. L'altro obiettivo della nostra ricerca è stato l'evidenziazione di correlazioni fra leptina e stato riproduttivo: a tal fine abbiamo scelto di lavorare con cagne cicliche in età fertile, dal momento che sia nella specie umana che in altre specie è stata evidenziata una variazione nei livelli di leptina durante le varie fasi di ciclo sessuale od estrale.

MATERIALI E METODI

Protocollo sperimentale

STUDIO 1

Sono stati utilizzati 130 cani (N=65 maschi; N=65 femmine), in buone condizioni di salute, di età compresa fra i 2 ed i 7 anni, sottoposti a visita veterinaria di routine. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sulla base del sesso e della taglia: taglia media (10-25 kg; M=38, F=41) e taglia grande (> 25 kg; M=27, F=24). Con il consenso del proprietario, ad ogni soggetto è stato effettuato un prelievo di sangue (1,5 ml) dalla vena cefalica dell'avambraccio. Il sangue è stato lasciato sierare a temperatura ambiente per 5 ore in provette di vetro non trattate e quindi centrifugato a 1600 giri/minuto. Il siero è stato stoccato a -20 °C fino alla determinazione delle concentrazioni di leptina e di GH. Tutti i soggetti erano stati alimentati la sera precedente il prelievo e le femmine erano in fase anestrata, confermata mediante determinazione dei livelli ematici di progesterone.

STUDIO 2

81 femmine normopeso, di taglia media e con età compresa fra i 2 ed i 7 anni sono state incluse in questo studio. Agli animali è stato effettuato un prelievo di sangue dalla vena cefalica, in presenza del proprietario. Il siero, ottenuto dal sangue (1,5 ml) raccolto in provette di vetro non trattate, è stato stoccato a -20 °C fino alla determinazione del progesterone e della leptina. Le concentrazioni ematiche di progesterone, i segni clinici e l'anamnesi sono stati utilizzati per definire la fase di ciclo estrale di ogni soggetto, così inserito in uno dei seguenti gruppi: proestro (N=43), estro (N=21) e diestro (N=17).

Dosaggi ormonali

Le concentrazioni ematiche di leptina sono state dosate mediante metodica immunoenzimatica (EIA) eterologa con un kit commerciale (Leptin EIA kit, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), sulla base dell'elevata conservazione della sequenza della leptina nelle specie umana e canina. I coefficienti di variazione intra- ed inter saggio sono stati del 4% e del 9%, rispettivamente. La sensibilità del saggio è stata 50 pg/ml. La determinazione del GH è stata effettuata mediante una metodica omologa competitiva immunoenzimatica (ELISA) validata precedentemente¹⁷ e modificata per la specie canina. I coefficienti di variazione intra- ed inter saggio sono stati del 5% e del 7%,

rispettivamente. La sensibilità del saggio è stata 200 pg/ml. Il dosaggio del progesterone è stato realizzato mediante tecnica radioimmunologica (RIA) validata precedentemente¹⁸. I coefficienti intra- ed inter saggio sono stati del 3,8% e del 10,5%, rispettivamente. La sensibilità del saggio è stata 70 pg/ml.

Analisi statistica

Tutti i risultati sono espressi come media \pm errore standard (ES); differenze evidenziate fra i vari gruppi sono state valutate mediante test di Student e si è considerata significativa una $p < 0,05$.

RISULTATI

STUDIO 1

Le concentrazioni basali di GH non hanno presentato differenze significative nei gruppi presi in esame: non vi sono infatti differenze né in relazione alla taglia né al sesso dei soggetti. In particolare, per il gruppo di animali di taglia media il valore medio basale è risultato pari a $2,51 \pm 0,12$ ng/ml nei maschi e a $2,63 \pm 0,17$ ng/ml nelle femmine. Analogamente, nel gruppo di soggetti di taglia grande, abbiamo rilevato valori di GH dell'ordine di $2,59 \pm 0,21$ ng/ml nei maschi e di $2,72 \pm 0,23$ ng/ml nelle femmine (Fig. 3). Dall'osservazione dei dati esposti si può altresì notare l'assenza di differenze significative fra animali dello stesso sesso, ma di taglia diversa. I livelli di leptina sono apparsi significativamente ($p < 0,05$) diversi in relazione al sesso dei soggetti, ma non alla taglia: i valori sierici rilevati nelle femmine sono stati $1,5 \pm 0,08$ ng/ml (taglia media) e $1,3 \pm 0,05$ ng/ml (taglia grande), mentre nei maschi di $0,6 \pm 0,04$ ng/ml (taglia media) e di $0,5 \pm 0,02$ ng/ml (taglia grande) (Fig. 4).

STUDIO 2

I risultati delle analisi dei campioni ematici hanno messo in evidenza un significativo ($p < 0,01$) aumento nei livelli della leptina ($2,13 \pm 0,19$ ng/ml) nei soggetti in fase estra-

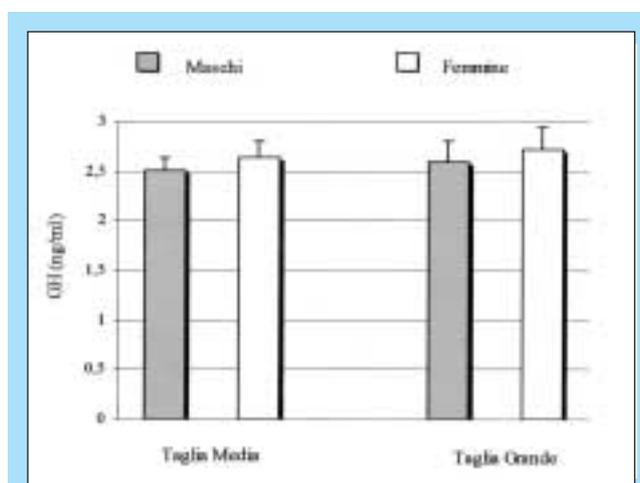


FIGURA 3 - Concentrazioni ematiche di GH (media \pm ES) in soggetti di taglia e sesso diversi.

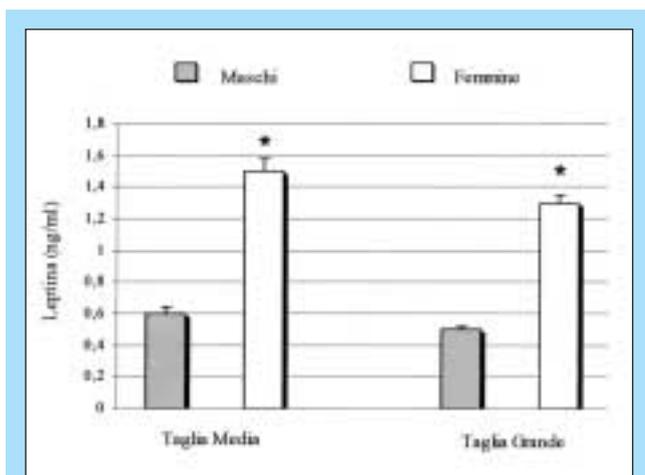


FIGURA 4 - Concentrazioni ematiche di leptina (media \pm ES) in soggetti di taglia e sesso diversi. * $p < 0,05$.

le, in concomitanza con l'aumento fisiologico dei tassi di progesterone. Le concentrazioni basali dell'ormone appaiono invariate durante il proestro ($0,92 \pm 0,09$ ng/ml) ed il diestro ($0,99 \pm 0,12$ ng/ml) (Fig. 5).

DISCUSSIONE

Il presente lavoro è stato condotto al fine di iniziare anche nella specie canina un percorso di studio sulle caratteristiche di un ormone metabolico scoperto a metà degli anni '90, la leptina. La biologia di questo ormone, spesso indicato anche come ob protein, è particolarmente complessa ed i primi effetti evidenziati erano relativi all'inibizione dell'assunzione del cibo, all'aumento del dispendio energetico e, conseguentemente, alla regolazione del peso corporeo. La letteratura più recente focalizza l'attenzione sul suo coinvolgimento nella modulazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, con particolare riferimento alla femmina nella quale lo stato metabolico condiziona fortemente le performances riproduttive. Il primo dato che emerge dall'indagine condotta è la diversa concentrazione ematica della leptina nei due sessi, con livelli ematici più che doppi nelle femmine: questo risultato è in linea con quanto già riportato in letteratura relativamente alle altre specie studiate^{7,19}. Diversi fattori sembrano essere responsabili di questo quadro endocrino: il principale è la percentuale di massa grassa, che non solo è quantitativamente più cospicua nella femmina, ma è anche distribuita in modo diverso rispetto al maschio, con un rapporto grasso sottocutaneo/viscerale più elevato. L'espressione della leptina appare più elevata proprio nei depositi di grasso sottocutaneo²⁰. È stato inoltre dimostrato che nelle donne i livelli di leptina totale in circolo sono maggiori rispetto agli uomini, ma risultano minori le concentrazioni di ormone legato alle proteine di trasporto con conseguente maggiore disponibilità di ormone libero e quindi biologicamente attivo²¹. Infine, il tessuto adiposo nelle femmine appare essere più sensibile agli ormoni come insulina e glicocorticoidi ed estrogeni²² che stimolano la produzione di leptina; gli androgeni, al contrario, ne riducono i livelli ematici²³. È interessante notare che il dimorfismo sessuale dei livelli ematici della leptina è già presente

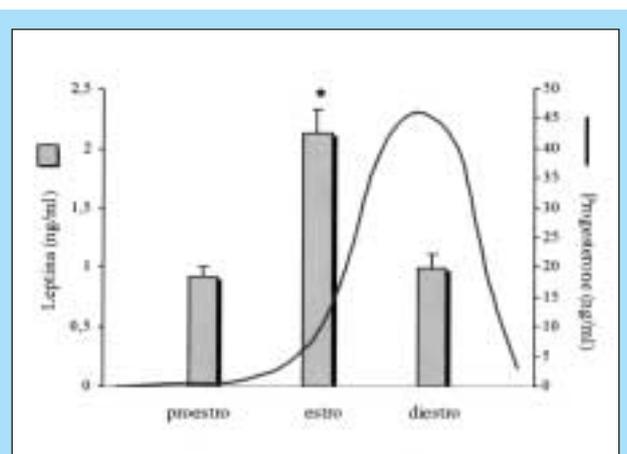


FIGURA 5 - Concentrazione ematica di leptina in relazione alle diverse fasi di ciclo estrale dei soggetti. * $p < 0,05$.

durante le ultime fasi di gestazione ed alla nascita^{24,25}, fenomeno verosimilmente correlato con gli elevati livelli di steroidi sessuali tipici dei neonati. Al contrario, per tutto il periodo prepubere non si rilevano differenze fra maschi e femmine e il dimorfismo riappare gradualmente alla pubertà, in parallelo con le variazioni a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. La maggioranza dei riscontri disponibili in letteratura pone l'accento sul coinvolgimento della leptina nella modulazione dell'attività riproduttiva della femmina. Sulla base di tali osservazioni, la nostra indagine si è focalizzata sulle variazioni di quest'ormone durante il ciclo estrale. Com'è noto, nella cagna si osserva un aumento della concentrazione del progesterone prima dell'ovulazione, causato dalla luteinizzazione delle cellule follicolari, in concomitanza con il calo dell'estradiolo. Questo quadro endocrino è responsabile delle modificazioni comportamentali ed ormonali con l'induzione dell'aumento della secrezione dell'ormone follicolo stimolante (FSH) e dell'ormone luteinizzante (LH) che, con il suo picco, determina l'ovulazione. I nostri dati indicano un significativo aumento nei livelli sierici di leptina in corrispondenza della fase di estro precoce, individuata sulla base dei rilievi anamnestici e dei livelli ematici di progesterone. La leptina potrebbe quindi avere una funzione di "ormone permissivo" sulla liberazione del picco pre-ovulatorio di LH, agendo a livello centrale e/o direttamente a livello ipofisario. È stato osservato che la leptina aumenta la pulsatilità dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH)²⁶ ed i neuroni GnRH-secretori esprimono i recettori per la ob protein²⁷. L'azione facilitatoria sulla liberazione di GnRH sarebbe tuttavia non di tipo diretto, ma mediata attraverso vie che coinvolgono interneuroni secernenti neuropeptidi di diversa natura fra i quali CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript Peptide), MCH (Melanocortin-Concentrating Hormone) e anche il galanin-like peptide. Oltre all'effetto stimolatorio a livello ipotalamico è stata ampiamente dimostrata un'azione diretta sull'ipofisi: circa il 90% delle cellule gonadotrope esprime infatti recettori per la leptina e la sua azione sulla secrezione dell'LH potrebbe esplicarsi attraverso l'attivazione della via dell'ossido nitrico sintetasi²⁸. A livello ipofisario una percentuale di cellule compresa fra il 20 ed il 25% del totale esprime la leptina e questo po-

trebbe essere indice anche di una regolazione autocrina: studi *in vitro* su linee cellulari umane e murine hanno del resto evidenziato la capacità della leptina di modulare la crescita e la differenziazione delle cellule ipofisarie¹¹. Le azioni a livello ipofisario sono state evidenziate primariamente sulle cellule somatotrope ed hanno permesso di individuare un'interazione fra leptina ed asse somatotropo. Il GH è un importante fattore lipolitico e la sua neuroregolazione è strettamente collegata allo stato delle riserve del tessuto adiposo. Le azioni della leptina sulla secrezione del GH sono state evidenziate sia indirettamente *in vivo*, inoculando antisiero anti leptina e rilevando una riduzione del normale rilascio di GH²⁹, che *in vitro* su colture ipofisarie, dove la leptina agisce stimolando sia la secrezione che l'espressione del GH³⁰. I dati da noi raccolti in questo studio non hanno evidenziato alcuna particolare correlazione fra i due ormoni: nelle femmine, dove i livelli di leptina risultano costantemente più elevati rispetto ai maschi, non abbiamo individuato un'analogia situazione per l'ormone somatotropo. È certamente da sottolineare che il protocollo seguito in questo lavoro non risulta pienamente rispondente allo studio dell'ormone somatotropo: la sua secrezione pulsatile richiederebbe, infatti, più prelievi nel corso della giornata per l'individuazione del profilo basale. Tuttavia, l'elevato numero di animali presi in considerazione e soprattutto la bassa pulsatilità dell'ormone ci permettono di considerare come basali i valori riportati. Il fatto che non vi siano differenze nelle concentrazioni ematiche di ormone somatotropo fra animali di taglia diversa si pone in linea con quanto ormai ampiamente riportato in letteratura: la concentrazione di ormone somatotropo non è, infatti, responsabile della crescita staturale dei soggetti, condizionata dalla pulsatilità del GHRH e dalla concentrazione delle IGFs (Insulin-like Growth Factors)³¹.

CONCLUSIONI

La leptina, la principale proteina secreta dal tessuto adiposo, è oggi considerata un fattore che può essere espresso da diversi sistemi e che esercita molteplici ruoli nei tessuti differenziati. I dati qui esposti sono in accordo con quanto già evidenziato in altre specie e contribuiscono ad avvalorare l'ipotesi che la leptina giochi un ruolo significativo nella modulazione dell'asse riproduttivo della femmina. Riteniamo che questo possa essere un punto di inizio per ulteriori approfondimenti riguardanti il suo ruolo fisiologico, ed eventualmente fisiopatologico nel cane. In questa specie, infatti, le performances riproduttive sono frequentemente compromesse dalle alterazioni dello stato nutrizionale e l'obesità si impone come una problematica clinica di grande impatto.

Parole chiave

Cane, leptina, ormone somatotropo, riproduzione.

Key words

Dog, leptin, growth hormone, reproduction.

Bibliografia

- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994.
- Zhang F, Basinski MB, Beals JM: Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387:206-209, 1997.
- Richards MP, Caperna TJ, Elsasser TH, et al: Design and application of a polyclonal peptide antiserum for the universal detection of leptin protein. *J Biochem Biophys Methods* 45:147-156, 2000.
- Ahima RS, Saper CF, Flier JS, et al: Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21:263-307, 2000.
- Hassink WG, de Lancey E, Sheslow DV, et al: Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 100:1-6, 1997.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, et al: The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793, 1998.
- Saad MF, Damani S, Gingerich RL, et al: Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:579-584, 1997.
- Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J, et al: Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 228:733-738, 1996.
- Saleri R, Grasselli F, Tamanini C: Indagine preliminare sulla leptina nella specie canina. *Atti 42° Congresso Nazionale SCIVAC*, p. 278.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al: Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell* 83:1263-1271, 1995.
- Jin L, Zhang S, Burguera BG, et al: Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141:333-339, 2000.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al: Effect of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:543-546, 1995.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al: The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377:530-532, 1995.
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381:415-421, 1996.
- Baratta M: Leptin - from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Sci Med Monit* 8:282-292, 2002.
- Hart BL, Eckstein RA: The role of gonadal hormones in the occurrence of objectionable behaviours in dogs and cats. *Appl Anim Behav Sci* 52:331-344, 1997.
- Baratta M, Saleri R, Mascadri C, et al: Modulation by galanin of growth hormone and gonadotropin secretion from perfused pituitary and median eminence of prepubertal male calves. *Neuroendocrinology* 66:271-277, 1997.
- Grasselli F, Baratta M, Tamanini C: Effects of a GnRH analogue (buserelin) infused via osmotic minipumps on pituitary and ovarian activity of prepubertal heifers. *Anim Reprod Sci* 32:153-161, 1993.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161, 1995.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, et al: Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47:913-917, 1998.
- McConway MG, Johnson D, Kelly A, et al: Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann Clin Biochem* 37:717-723, 2000.
- Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, et al: Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154:285-292, 1997.
- Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, et al: Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3243-3246, 1998.
- Matsuda J, Yokota I, Iida M, et al: Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1642-1644, 1997.
- Helland IB, Reseland JE, Saugstad OD, et al: Leptin levels in pregnant women and newborn infants: gender, differences and reduction during the neonatal period. *Pediatrics* 101:E12, 1998.
- Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, et al: Cocaine and Amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. *J Neuroendocrinol* 12:383-385, 2000.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA: Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60:216-222, 1999.
- Yu WH, Walczewska A, Karanth S, et al: Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from pituitary gland. *Endocrinology* 138:5055-5058, 1997.
- Carro E, Senaris R, Considine RV, et al: Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 138:2203-2206, 1997.
- Baratta M, Saleri R, Mainardi GL, et al: Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. *Endocrinology* 143:551-557, 2002.
- Liu JL and LeRoith D: Insulin-like growth factor-I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* 140:5178-5184.