

# Il tessuto adiposo come organo endocrino: ruolo della diagnostica di laboratorio nell'obesità e nella sindrome metabolica

R. Tozzoli

Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale "Beata Vergine delle Grazie", Latisana (UD)

## Riassunto

In tutto il mondo, l'incremento della prevalenza dell'obesità e delle patologie ad essa associate (note come sindrome metabolica), rappresenta un serio problema per la sanità pubblica e i sistemi sanitari.

L'obesità è attualmente considerata uno stato infiammatorio di basso grado, indotto da numerosi mediatori, chiamati adipocitochine o adipochine, prodotte dal tessuto adiposo bianco viscerale: queste molecole presentano caratteristiche funzionali diverse, con attività ormonale, citochimica e chemochinica, enzimatica, di marcatori della fase acuta dell'infiammazione e di trasporto dei lipidi e sono prodotte da diversi tipi cellulari: adipociti, pre-adipociti, cellule endoteliali, fibroblasti e macrofagi.

Non sono completamente conosciute le cause e i meccanismi fisiopatologici che inducono lo stato flogistico associato all'obesità: tuttavia le adipochine sembrano rappresentare il legame biochimico tra obesità, infiammazione e sindrome metabolica.

In questo articolo sono brevemente analizzati la fisiopatologia del tessuto adiposo nell'obesità, la funzione delle adipochine in condizioni normali e patologiche e il ruolo dei sistemi immunometrici a determinazione multipla, recentemente messi a punto per il dosaggio delle adipochine nel siero dei pazienti affetti da obesità e sindrome metabolica. Tra questi, i sistemi multipli basati sull'impiego di microsferi indirizzate si basano sui principi dei metodi convenzionali immunoenzimatici tipo sandwich, evidenziano simili caratteristiche analitiche di accuratezza e imprecisione, robustezza e facilità d'uso, permettono la quantificazione di numerose adipochine contemporaneamente nello stesso campione (profilo adipochinico o 'adipoma') e rappresentano un potente strumento per la diagnosi dell'obesità e delle complicanze ad essa associate.

## Summary

**Adipose tissue as an endocrine organ: the diagnostic role of laboratory in obesity and metabolic syndrome**

Worldwide, the increasing prevalence of obesity and associated complications (metabolic syndrome) are likely to pose a serious challenge to the public health and medical care systems.

The obesity state is now considered a low-grade systemic inflammation, induced by different mediators called adipocytokines or adipokines, produced by the white visceral adipose tissue. These molecules are hormone-like factors, cytokines and chemokines, inflammatory markers, enzymes and lipid transporters, and are synthesized by different types of cells: adipocytes, pre-adipocytes, endothelial cells, fibroblast and macrophages.

The causes and mechanisms involved in obesity-induced inflammatory state are not fully understood. However the adipokines seem to be the link between obesity, inflammation and obesity-related complications.

The present article briefly discusses the pathophysiology of adipose tissue in obesity, the functions of adipokines in normal and pathological conditions, and the role of recent multiplex immunoassay systems for the measurement of adipokine concentrations in serum of obese patients. Addressable bead-based multiplex immunoassays share the sandwich conventional ELISA principle, present similar robustness, accuracy and precision, enable the measurement of multiple adipokines in a single sample (adipose tissue profile or adipome) and are a powerful tool for the diagnosis of obesity and associated complications.

*Key-words:* Adipose tissue, adipokines, obesity, metabolic syndrome, multiplex immunoassay.

## Introduzione

Gli studi epidemiologici più recenti documentano il rapido incremento della prevalenza dell'obesità in tutti i paesi industrializzati: stime attendibili indicano che circa un miliardo di persone siano affette da sovrappeso e circa 300.000 da obesità in tutto il mondo<sup>1</sup>. Con l'incremento di soggetti affetti da obesità, è in aumento anche la prevalenza delle complicanze legate ad un eccesso di tessuto adiposo. Le complicanze metaboliche dell'obesità, definite come sindrome metabolica, consistono nella resistenza insulinica (che culmina nell'insufficienza delle  $\beta$ -cellule insulari, alterata tolleranza al glucosio e diabete di tipo 2), nella dislipidemia, nell'iperuricemia e nell'ipertensione. La presenza della sindrome metabolica è associata a un significativo incremento del rischio di complicazioni cardio-vascolari (insufficienza cardiaca, malattia coronarica e ictus), a disordini endocrini (sindromi iperandrogeniche, sindrome dell'ovaio policistico), ad apnea ostruttiva e disturbi respiratori polmonari, a colelitiasi, steatosi epatica e malattia da reflusso gastro-esofageo<sup>2</sup>.

Vi è ormai ampio consenso nel considerare l'obesità una condizione clinica caratterizzata da uno stato infiammatorio sistemico di basso grado, indotto da differenti mediatori prodotti interamente dal tessuto adiposo<sup>3</sup>.

## Il tessuto adiposo come organo multifunzionale

Per molto tempo il tessuto adiposo è stato considerato un organo con funzioni semplici, rappresentate dalla capacità di isolare l'organismo dal punto di vista termico e meccanico e di immagazzinare l'eccesso di energia sotto forma di trigliceridi ad alta densità calorica, per restituirla al bisogno come acidi grassi liberi. Da circa 15 anni si è invece affermata la convinzione che in realtà esso è un organo dinamico, coinvolto in un'ampia gamma di processi biologici e metabolici, in particolare di natura endocrina, autocrina e paracrina<sup>4</sup>.

Due tipi di tessuto adiposo sono presenti nei mammiferi, il tessuto adiposo bianco e il tessuto adiposo bruno, con differente composizione cellulare e localizzazione: essi nel loro insieme costituiscono l'organo adiposo.

La componente cellulare dell'organo adiposo è costituita da due citotipi fondamentali, gli adipociti bianchi e bruni. Gli adipociti bianchi maturi presentano un vacuolo centrale ricco di trigliceridi, che schiaccia in periferia il nucleo, e un sottile strato citoplasmatico. Gli adipociti bruni hanno invece un nucleo centrale e grossi mitocondri, con piccole goccioline di trigliceridi sparse nel citoplasma. Gli adipociti bianchi hanno un tradizionale ruolo di deposito di molecole ad alta energia, mentre gli adipociti bruni sono deputati alla termogenesi.

Per quanto riguarda la localizzazione, la maggior parte dell'organo adiposo nell'adulto è costituita da depositi sottocutanei e viscerali di tessuto adiposo bianco. Il tessuto sottocutaneo interessa l'intera superficie corporea: nella femmina è particolarmente sviluppato nelle regioni gluteo-femorale e mammaria, mentre nel maschio è presente specialmente in sede addominale. Gran parte del tessuto viscerale è costituito dal grasso mesenterico e omentale. Il tessuto adiposo bruno, meno diffuso e rappresentato, tende invece a accogliersi in regione sopraclavare, laterocer-

vicale, paravertebrale e mediastinica<sup>5</sup>.

Assieme agli adipociti, altri tipi di cellule costituiscono il tessuto adiposo bianco: pre-adipociti, fibroblasti, cellule endoteliali e macrofagi<sup>3</sup>.

Gli adipociti, i preadipociti e i macrofagi hanno funzioni metaboliche e infiammatorie: i macrofagi in particolare sono responsabili della presenza in circolo di specifiche molecole, capaci di indurre uno stato flogistico di basso grado correlato all'obesità: esse rappresentano quindi il legame biochimico tra obesità, infiammazione e sindrome metabolica<sup>6</sup>.

## Le adipocitochine

Il tessuto adiposo bianco, con i suoi diversi tipi cellulari secerne oltre 100 molecole biologicamente attive, complessivamente denominate adipocitochine o adipochine: sulla base delle loro caratteristiche funzionali, esse possono essere distinte in (Tab. I e II):

1. molecole ad attività ormonale;
2. molecole ad attività citochinica/chemochinica;
3. molecole ad attività coagulativa e vascolare;
4. molecole connesse con il metabolismo/trasporto dei lipidi;
5. molecole ad attività enzimatica;
6. molecole ad attività di proteine della fase acuta dell'infiammazione.

Queste molecole sono responsabili delle interazioni tra il tessuto adiposo, il tessuto muscolare, i surreni e il sistema nervoso centrale e simpatico. Esse inoltre contribuiscono al controllo del bilancio energetico dell'organismo e della sensibilità all'insulina, e alla regolazione della pressione arteriosa, della risposta immunitaria, dell'angiogenesi, del metabolismo lipidico e dell'emostasi<sup>7</sup>: costituiscono quindi un *network* di regolazione dell'infiammazione, dell'attività insulinica e del metabolismo glucidico a livello locale e sistemico.

Questo *network* è alterato nell'obesità e contribuisce a generare uno stato flogistico ed un alterato metabolismo dell'adipocita, con meccanismi che non sono tuttavia ancora completamente conosciuti.

L'obesità, condizione legata a uno squilibrio tra alimentazione e consumo, altera l'omeostasi metabolica sistemica e induce un'incremento del tessuto adiposo viscerale, che produce a sua volta un processo infiammatorio con incremento di numerose citochine proinfiammatorie.

In condizioni normali, gli adipociti bianchi accumulano lipidi e regolano l'omeostasi metabolica, mentre i macrofagi del tessuto bianco, con polarizzazione funzionale di tipo M2, liberano arginasi (ad attività inibitoria sulla ossido nitrico-sintetasi) e citochine anti-infiammatorie (IL-10 e IL-1RA). In condizioni di obesità, il tessuto adiposo bianco viscerale si infiamma per un'azione combinata tra gli adipociti e i macrofagi: i primi crescono in numero (iperplasia) e dimensioni (ipertrofia), i secondi infiltrano in misura elevata il tessuto, aggregandosi in strutture simili a corone (*crown-like structures*), attorno ad adipociti in disfacimento simil-necrotico e attivandosi dal tipo 2 al tipo 1, con rilascio di ossido nitrico-sintetasi e di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$  e IL-6)<sup>8</sup>: numerose altre adipocitochine sono coinvolte in questo processo, che origina probabilmente dall'ipossia causata dall'ipoperfusione nel tessuto

**Tabella I.** Le principali adipocitochine (nella ultima colonna viene indicato il numero di articoli pubblicati sull'argomento e presenti in PubMed).

Adipochine	Ruolo (i) principale (i)	Sede di produzione	Rif. (n.)
<b>Adipochine ad attività ormonale</b>			
Leptina	Stimola il senso di sazietà, la lipolisi, il metabolismo del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi, aumenta l'insulino-sensibilità	Adipocita	168
Adiponectina	Regola il metabolismo epatico del glucosio, aumenta l'insulino-sensibilità	Adipocita	77
Resistina	Induce insulino-resistenza (?)	Adipocita, macrofago	25
Adipsina	Stimola l'accumulo di trigliceridi, inibisce la lipolisi	Adipocita, macrofago	2
Apelina	Inibisce la secrezione insulinica	Adipocita, macrofago	4
Visfatina	Presenta attività insulino-simile, induce insulino-sensibilità, ha attività lipogenica	Adipocita	3
Vaspina	Aumenta l'insulino-resistenza	Adipocita	3
Omentina	Modula l'attività insulinica	Macrofago	2
Lipocalina 2	Induce insulino-sensibilità	Adipocita, macrofago	2
Proteina legante il retinolo 4	Induce insulino-resistenza	Adipocita	20
Chemirina	Stimola l'adipogenesi e l'insulino-resistenza	Adipocita	4
<b>Adipochine ad attività citochinica/chemochinica, coinvolte nell'infiammazione</b>			
IL-6	Citochina pro-infiammatoria, stimola la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi, contrasta l'azione dell'insulina e della leptina	Adipocita, macrofago, cellula endoteliale stromale	8
TNF- $\alpha$	Citochina pro-infiammatoria, induce insulino-resistenza, aumenta la lipolisi	Adipocita, macrofago	8
sTNF-RII	Citochina pro-infiammatoria, induce insulino-resistenza, aumenta la lipolisi	Adipocita e macrofago	5
IL-1RA	Citochina anti-infiammatoria, diminuisce l'insulino-sensibilità	Macrofago	1
IL-10	Citochina anti-infiammatoria	Adipocita, macrofago	1
IL-8	Chemochina pro-infiammatoria	Cellule endoteliali stromali	2
MCP-1	Chemochina pro-infiammatoria, altera l'insulino-sensibilità, aumenta la lipolisi	Adipocita, macrofago	4
<b>Adipochine ad attività coagulativa e vascolare</b>			
PAI-1	Ha attività protrombotica, aumenta l'insulino-resistenza	Cellula endoteliale stromale	6
<b>Adipochine ad attività di trasporto e metabolismo dei lipidi</b>			
FABP-4	Trasporta acidi grassi	Adipocita	3
<b>Adipochine ad attività enzimatica</b>			
Catepsina S	Degrada l'elastina, inducendo sviluppo di lesioni aterosclerotiche	Adipocita, macrofago	2
GPX-3	Presenta attività anti-ossidante	Adipocita	1
ACE	Converte angiotensina I in angiotensina II	Cellula endoteliale stromale	1
<b>Adipochine come proteine della fase acuta</b>			
CRP	Stimola l'espressione di citochine e di molecole di adesione	Adipocita	8
SAA	Stimola la chemiotassi dei monociti e l'espressione di molecole di adesione nelle cellule endoteliali	Adipocita	3

**Tabella II.** Altre adipocitochine.

Ad attività ormonale:	grelina, IGF-1
Ad attività di trasporto e metabolismo dei lipidi:	LPL; CETP; Apo-E
Ad attività citochinica-chemochinica:	IL-1 $\beta$ ; IL-4; IL-18; MIF; TGF- $\beta$ 1; NGF; VCAM-1; HGF; VEGF; ICAM-1
Ad attività enzimatica:	citocromo p450-aromatasi; 17-HSD; 11-HSD-1; Renina
Ad attività coagulativa e vascolare:	TF; angiotensinogeno
Come proteine della fase acuta:	aptoglobina; ZAG

bianco ipertrofico e iperplastico<sup>9</sup>.

Tra tutte le adipochine secrete dal tessuto adiposo, oltre una ventina presentano concentrazioni circolanti aumentate nei soggetti obesi: alcune di queste come la proteina C-reattiva, l'aptoglobina e l'amiloide A sono proteine della fase acuta, principalmente prodotte in risposta allo stimolo infiammatorio indotto dall'obesità viscerale; molte delle rimanenti 21 molecole sono proteine infiammatorie come IL-6, IL-8, IL-18, IL-1RA, TNF- $\alpha$ , sTNF-RII, prodotte prevalentemente da macrofagi e cellule endoteliali. La leptina e la FABP-4 per contro sono certamente prodotte dagli adipociti. Altre proteine (adiponectina e GPX-3) presentano invece concentrazioni circolanti diminuite nell'obesità (Tab. I)<sup>10</sup>.

### **Ruolo diagnostico del dosaggio delle adipochine nell'obesità e nella sindrome metabolica**

Criteri internazionali per definire la sindrome metabolica sono stati recentemente stabiliti dalla Federazione Internazionale per il Diabete (IDF): presenza di obesità viscerale associata alla presenza di almeno 2 componenti, quali aumentati livelli di trigliceridi, ridotti livelli di HDL-colesterolo, ipertensione e alterata glicemia a digiuno<sup>11</sup>. Il documento raccomanda altri criteri per la diagnosi di sindrome metabolica, costituiti da aumentate concentrazioni circolanti di alcune adipochine (CRP, SAA, TNF- $\alpha$ , IL-6, PAI-1) o da diminuite concentrazioni circolanti di altre (adiponectina).

Il ruolo fisiopatologico e diagnostico delle adipocitochine è stato oggetto di numerosi studi apparsi in letteratura negli ultimi 10 anni, con l'obiettivo di dimostrare l'importanza del dosaggio delle loro concentrazioni in circolo in soggetti affetti da obesità e da sindrome metabolica. Nell'ottica dell'individuazione di marcatori biochimici in grado di aumentare le informazioni ottenute da parametri clinici e di chiarire i meccanismi fisiopatologici della sindrome metabolica, le adipochine sono considerate candidati sempre più promettenti<sup>12</sup>.

Tuttavia la natura multifattoriale della sindrome rappresenta un ostacolo difficilmente sormontabile con l'impiego di un approccio classico basato sul dosaggio di biomarcatori individuali come indicatori di malattia: si ritiene necessaria l'identificazione di *pattern* o profili di molecole per la caratterizzazione della patologia. La definizione di profili molecolari non è possibile mediante l'impiego di tecnologie convenzionali come il saggio immunoenzimatico, anche se applicati su analizzatori automatici ad alta produttività.

Con l'obiettivo di superare i limiti delle misurazioni immunometriche convenzionali, negli ultimi anni la strategia *multimarker*, conseguente all'impiego di tecnologie basate sui principi della proteomica, ha prodotto lo sviluppo di sistemi analitici in grado di consentire misurazioni parallele multiple di molecole proteiche nello stesso campione e ambiente di reazione (*multiplexing*)<sup>13,14</sup>. I sistemi a determinazione multipla possono essere impiegati per la diagnosi precoce e la predizione, la diagnosi differenziale, la stadiazione di malattia e la definizione della prognosi nel campo delle malattie metaboliche, allergiche, autoimmuni, infettive, etc.

### **Piattaforme analitiche multiple basate sull'impiego di anticorpi**

I metodi immunologici multiplex impiegano i principi tradizionali degli immunodosaggi convenzionali: i sistemi predominanti usano anticorpi o proteine/peptidi come molecole di legame per rilevare proteine, anticorpi o autoanticorpi e sono distinguibili in due principali categorie: i *microarray* planari e non planari (in sospensione)<sup>13</sup>.

I sistemi *multiplex* del primo tipo consistono di microspot ad alta densità di ligandi a cattura immobilizzati su una superficie rigida. I traccianti sono in genere di tipo chemiluminescente e conferiscono al sistema alta sensibilità ed ampio *range* dinamico del saggio. Questi sistemi, in genere manuali, possono essere automatizzati mediante distributori automatici.

I sistemi *multiplex* in sospensione impiegano microsferi coniugate con differenti ligandi a cattura e identificate in base alla dimensione o al colore, secondo i principi della citometria a flusso (microsferi indirizzate): la loro principale caratteristica è l'elevata precisione nella misura, anche se il *range* dinamico è inferiore di due ordini di grandezza rispetto ai sistemi di primo tipo. Questi sistemi possono essere facilmente automatizzati su analizzatori ad alta produttività.

Nonostante la versatilità di impiego dei *microarray* per la quantificazione di proteine nel siero e in altri liquidi biologici e la loro vasta diffusione per scopi di ricerca, attestata da centinaia di pubblicazioni scientifiche, solo un limitato numero di metodi sono stati introdotti in uso commerciale<sup>15</sup>. In particolare per il dosaggio delle citochine, la tecnologia prevalente approvata per l'uso clinico è quella dei *microarray* in sospensione ed in particolare delle microsferi indirizzate a configurare i cosiddetti immunodosaggi multipli (MIA)<sup>15</sup>.

### **Il profilo delle adipochine nell'obesità e nella sindrome metabolica**

Determinazioni simultanee di citochine sono state introdotte nell'uso clinico secondo profili diversi. I sistemi analitici più diffusi sono il Cytokine Bead Array (BD Biosciences) e il Luminex (Luminex Corporation): il secondo di questi vanta numerose applicazioni commerciali (Linco Research, BioRad, R&D Systems, Biosource International, Upstate, Panomics, etc).

Un'analisi della letteratura (luglio 2010) riferita all'impiego della determinazione quantitativa con metodi immunometrici di diverse adipochine umane circolanti nell'obesità e nella sindrome metabolica, evidenzia che su circa 300 lavori complessivi: a) il metodo convenzionale ELISA viene utilizzato direttamente o per confronto in tutti gli studi, b) in 15 studi sono utilizzati profili multipli, con un numero di adipochine in genere superiore a 5, e c) in 6 studi sono stati impiegati dosaggi MIA (da 3 a 25 citochine diverse).

Tra le adipochine rilevate, la leptina è stata dosata da sola o in associazione in 168 studi (55,8%), l'adiponectina è stata indagata in 77 studi (25,6%) e la resistina in 25 (8,3%); 37 altre adipochine sono state prese in esame, con un numero di studi compreso tra 1 e 8 per ciascuna di esse.

Considerando che la produzione locale (paracrina e autocrina) di molte adipochine non determina nei soggetti affetti da obesità e sindrome metabolica variazioni delle

**Tabella III.** Profilo diagnostico delle adipochine nell'obesità e nella sindrome metabolica (in corsivo sono indicate le adipochine comprese nei criteri internazionali di diagnosi).

Adipochina	Sede di produzione prevalente	Variazione nell'obesità e nella sindrome metabolica	Indicatore
Leptina	Adipocita	Aumento	Resistenza insulinica, Dislipidemia
<i>Adiponectina</i>	Adipocita	Diminuzione	Resistenza insulinica
Adipsina	Macrofago	Aumento	Dislipidemia
Chemerina	Adipocita	Aumento	Resistenza insulinica, Dislipidemia
RBP-4	Adipocita	Aumento	Resistenza insulinica
<i>IL-6</i>	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
IL-8	Cellula endoteliale	Aumento	Flogosi
IL-10	Macrofago	Aumento	Flogosi
IL-1RA	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
sTNF-RII	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
MCP-1	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
VCAM-1	Cellula endoteliale	Aumento	Aterosclerosi
<i>PAI-1</i>	Cellula endoteliale	Aumento	Aterosclerosi, Resistenza insulinica
FABP-4	Adipocita	Aumento	Dislipidemia
Catepsina S	Macrofago	Aumento	Aterosclerosi
GPX-3	Adipocita	Diminuzione	Dislipidemia, Aterosclerosi
ACE	Cellula endoteliale	Aumento	Iperensione
<i>CRP</i>	Adipocita	Aumento	Flogosi
<i>SA</i>	Adipocita	Aumento	Flogosi

loro concentrazioni circolanti, il profilo adipocitochinico ('adipoma') da utilizzare per finalità diagnostiche e prognostiche dovrebbe, a nostro parere, comprendere molecole che: a) presentano un ruolo importante nella patogenesi delle componenti della sindrome metabolica, b) provengono da tutte le diverse componenti cellulari dell'organo adiposo e c) evidenziano significative variazioni delle concentrazioni nel siero (in aumento o in diminuzione) nei pazienti obesi rispetto ai soggetti sani). Un elenco ragionato è indicato nella Tabella III.

### Aspetti analitici del dosaggio *multiplex* delle adipochine

L'impiego di sistemi analitici per il dosaggio simultaneo delle adipochine genera numerosi problemi di ordine analitico: dai primi dati presenti in letteratura il sistema maggiormente impiegato (*microarray* in sospensione a microsferi indirizzate) sembra presentare un discreto grado di affidabilità per quanto riguarda le caratteristiche del processo di produzione (dimensione delle microsferi), della calibrazione multipla (impiego di materiali di calibrazione contenenti adipochine naturali e ricombinanti) e della reattività crociata (in genere bassa nei sistemi a flusso). Tuttavia, prima dell'impiego clinico vanno attentamente validati l'intervallo di linearità, la specificità, l'imprecisione, la sensibilità e l'accuratezza rispetto ai metodi consolidati convenzionali<sup>13,16</sup>.

### Bibliografia

1. Ford ES, Mokdad AH. Epidemiology of obesity in the western hemisphere. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (Suppl 1) S1-8.
2. Schelbert KB. Comorbidities of obesity. *Prim Care* 2009; 36:271-85.
3. Ferrante AW Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007; 262:408-14.
4. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316:129-39.
5. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360:1509-17.
6. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34:2-11.
7. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009; 9:1847-56.
8. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005; 46:2347-55.
9. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes* 2009; 33:54-66.
10. Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm* 2010; Epub 2010 May 23.

11. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The national cholesterol education program-adult treatment panel III, international diabetes federation, and world health organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30:8-13.
12. Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature* 2008; 451:949-52.
13. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin Chem* 2010; 56:186-93.
14. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2007; 6:334-40.
15. Hartmann M, Roeraade J, Stoll D, Templin MF, Joos TO. Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393:1407-16.
16. Schipper HS, de Jager W, van Dijk ME, Meerding J, Zelissen PM, Adan RA, et al. A multiplex immunoassay for human adipokine profiling. *Clin Chem* 2010; 56:1320-8.