

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di ricerca in Tecnologie Biomediche

XXV ciclo



**IDENTIFICAZIONE DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE PER  
IL CONTROLLO DELL'OBESITÀ E DELLA CACHESSIA  
MEDIANTE UTILIZZO DI NUOVI COMPOSTI  
PEPTIDOMIMETICI DOTATI DI ATTIVITÀ ANTAGONISTA O  
AGONISTA DELL'ORMONE PEPTIDICO ENDOGENO GHRELIN**

Coordinatore: Prof. ssa Marina Del Puppo

**Relatore: Chiar.mo Prof. Vittorio Locatelli**

Tesi di:

**Dott.ssa Laura Rizzi**

Matr. n° 048540

Anno Accademico 2011/2012

*Credo di poter affermare che nella ricerca scientifica  
né il grado di intelligenza  
né la capacità di eseguire e portare a termine il compito intrapreso  
siano fattori essenziali per la riuscita e per la soddisfazione personale.*

*Nell'uno e nell'altro  
contano maggiormente la totale dedizione  
e il chiudere gli occhi davanti alle difficoltà:  
in tal modo possiamo affrontare i problemi che gli altri,  
più critici e più acuti,  
non affronterebbero.*

*(Rita Levi Montalcini)*

## ***Indice***

<b><i>Riassunto</i></b> .....	<b>4</b>
<b><i>Introduzione</i></b> .....	<b>11</b>
<b><i>Scopo</i></b> .....	<b>76</b>
<b><i>Materiali e Metodi</i></b> .....	<b>79</b>
<b><i>Risultati</i></b> .....	<b>95</b>
<b><i>Discussione</i></b> .....	<b>119</b>
<b><i>Figure</i></b> .....	<b>128</b>
<b><i>Bibliografia</i></b> .....	<b>162</b>
<b><i>Ringraziamenti</i></b> .....	<b>185</b>

## ***Riassunto***

La cachessia (dal greco “*kakos*”: cattivo ed “*hexis*”: condizione) è una condizione caratterizzata da perdita di peso, anoressia, astenia, perdita di massa muscolare, deplezione dei depositi adiposi e aumento del dispendio energetico. Essendo frequentemente associata a diverse patologie, tra cui neoplasie e AIDS, la cachessia rappresenta una delle maggiori cause di morbilità e mortalità e, in alcuni casi può divenire essa stessa la causa del decesso. Anche il trattamento con farmaci citotossici, tra i quali spicca il cisplatino, si associa all’insorgenza di significativi effetti collaterali che spesso concorrono a esacerbare la cachessia e l’anoressia indotti dalla neoplasia. Il meccanismo fisiopatologico che determina lo stato di cachessia è ancora sconosciuto e attualmente non esistono terapie farmacologiche in grado di contrastare tale forma di deperimento organico.

Un trattamento precoce della perdita di peso è da tempo considerato un fattore prognostico favorevole in oncologia. Pertanto in questi ultimi anni è stata rivolta molta attenzione al supporto nutrizionale nel paziente oncologico, in cui un aumento dell’assunzione di cibo potrebbe contribuire a migliorare la qualità di vita, la tollerabilità della chemioterapia e la risposta globale al trattamento antineoplastico.

L’obesità deriva da uno squilibrio tra l’energia introdotta e il dispendio energetico, quindi da un’eccessiva introduzione di cibo, da una ridotta spesa energetica o da una combinazione di questi fattori. L’obesità è una patologia che colpisce un numero sempre crescente di individui e rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica nel mondo occidentale. Appare quindi evidente che la ricerca di nuovi composti in grado di ridurre il senso di fame e quindi di limitare l’assunzione di cibo potrebbe costituire un valido presidio farmacologico per il trattamento dell’obesità e della sindrome metabolica.

Obesità e cachessia derivano da una scorretta assunzione di cibo. Quest’ultima è regolata dall’interazione tra fattori neuronali e ormonali e specifiche aree cerebrali, in particolare dell’ipotalamo, che sono deputate al controllo di tale funzione. Tra i mediatori periferici, un ruolo rilevante è svolto da ghrelin e dalla leptina.

Ghrelin è un peptide endogeno di 28 aminoacidi, sintetizzato e secreto principalmente dalle cellule della mucosa ossintica dello stomaco. È in grado di stimolare efficacemente sia in vitro che in vivo la liberazione dell’ormone somatotropo (GH), mediante l’interazione con il recettore dei *growth hormone*

*secretagogues* (GHS), denominato *growth hormone secretagogues receptor 1a* (GHS-R1a).

I GHS costituiscono un gruppo numeroso di molecole sintetiche peptidiche e non peptidiche, che condividono con ghrelin diverse proprietà e che per questo motivo sono state, e sono tuttora, oggetto di numerose ricerche soprattutto in ambito endocrino, in virtù della loro scarsa tossicità e della loro relativa economicità. Tuttavia, in questi ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che oltre a stimolare il rilascio di GH, sia ghrelin che i GHS svolgono anche diverse azioni extra-endocrine; tra queste spicca la capacità di stimolare efficacemente, l'assunzione di cibo e l'accumulo di tessuto adiposo, nell'uomo e nell'animale da esperimento.

In virtù di tali proprietà, l'obiettivo di questo studio è stato la ricerca di nuovi composti peptidomimetici, analoghi di ghrelin, agonisti e antagonisti del GHS-R1a, che potessero rivelarsi utili strumenti terapeutici sia in modelli di cachessia che in modelli di obesità sperimentale. L'effetto dei diversi composti è stato confrontato con quello prodotto da hexarelin, un GHS esapeptidico ben caratterizzato in numerosi studi per le sue proprietà GH-rilascianti e oresizzanti.

Il progetto è stato suddiviso in due parti sperimentali; la prima riguardante gli studi *in vitro*, è stata condotta allo scopo di caratterizzare l'attività farmacologica dei composti peptidomimetici in cellule transfettate con un plasmide contenente la sequenza completa del gene per il GHS-R1a umano.

Ghrelin, hexarelin e i composti in esame sono stati studiati singolarmente o in associazione con hexarelin alla concentrazione di  $10^{-6}$ M. Questo ci ha permesso di individuare tra i composti quelli ad attività antagonista o agonista. Questi ultimi sono stati studiati in un modello di cachessia indotta dalla somministrazione di cisplatino al fine di validare la capacità del composto di antagonizzare gli effetti indotti dal chemioterapico sul comportamento alimentare e sul peso corporeo. I composti ad azione antagonista sono stati invece studiati in un modello di obesità indotta da dieta iperlipidica al fine di identificare quelli capaci di contrastare l'aumento di peso e gli effetti sulla distribuzione del grasso corporeo.

Per indurre uno stato di cachessia nel quale testare i composti, il cisplatino è stato somministrato una volta al giorno, per i primi tre giorni di trattamento, alla dose di 1 mg/kg. Hexarelin e i JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894 e JMV 2903 sono stati somministrati intraperitonealmente (i.p.) due volte al giorno alla dose di 320 µg/kg per 11 giorni.

I risultati ottenuti nei nostri esperimenti hanno dimostrato che il trattamento con cisplatino è in grado di indurre una significativa riduzione del peso corporeo che diventa massima a 4 giorni dopo l'inizio del trattamento. La somministrazione di hexarelin e di JMV 2894, ma non quella degli altri composti, è in grado di contrastare la perdita di peso. Tale effetto non è però imputabile all'effetto oresizzante dei peptidi in quanto la quantità totale di cibo consumata dagli animali trattati con GHS non differisce significativamente da quella assunta dagli animali trattati solamente con cisplatino.

Essendo noto dalla letteratura che ghrelin e alcuni GHS stimolano l'adiposità, abbiamo verificato se il trattamento per 11 giorni con i GHS avesse aumentato la massa dei tessuti adiposi. Per questo dagli animali sono stati prelevati i depositi adiposi perirenale, sottocutaneo ed epididimale. I dati ottenuti hanno dimostrato che non vi sono variazioni significative del peso dei depositi adiposi tra animali trattati con il solo cisplatino e quelli trattati con GHS e cisplatino. Tale risultato ha suggerito la possibilità che i GHS, in virtù della loro attività GH-rilasciante, potessero avere effetti sulla massa muscolare. Poiché diversi studi hanno dimostrato che MuRF-1, un enzima del sistema proteolitico ubiquitina-proteasoma, svolge un ruolo importante nel catabolismo proteico muscolare e che la sua espressione aumenta in diverse condizioni patologiche caratterizzate da atrofia muscolare, quali la cachessia, abbiamo valutato il coinvolgimento di tale enzima nell'azione dei GHS. L'analisi dell'espressione genica di MuRF-1 nel muscolo scheletrico dei ratti sottoposti a trattamento per 11 giorni con i GHS e cisplatino ha dimostrato che i composti tendevano a ridurre i livelli di mRNA di MuRF-1 rispetto a quelli osservati nei ratti trattati con solo cisplatino, e che gli effetti indotti dal composto JMV 2894 erano statisticamente significativi, suggerendo pertanto un'azione anticatabolica.

Un altro obiettivo di questo lavoro è stato l'identificazione e caratterizzazione dei ligandi dotati di attività antagonista sul GHS-R1a allo scopo di identificare nuove molecole in grado di svolgere un'attività inibitoria sul comportamento alimentare e sul metabolismo energetico per identificare nuovi farmaci potenzialmente utili per il trattamento dell'obesità. Abbiamo pertanto testato EP 80317 e JMV 2959 in un modello murino di obesità.

L'obesità è stata indotta nei topi del ceppo C57BL/6J (6 settimane di vita; peso corporeo di 20g circa) mediante la somministrazione di una dieta iperlipidica composta dal 65% di grassi (HFD) per 9 settimane.

I topi esposti alla dieta HFD hanno evidenziato un aumento del peso corporeo raddoppiato rispetto a quello dei topi dello stesso ceppo alimentati con dieta standard; il valore di *Body Mass Index* (BMI), che era circa 0.33 all'inizio dell'esperimento, ha raggiunto un valore di circa 0.40 al termine delle 9 settimane di osservazione.

Al raggiungimento dello stato di obesità è iniziato il trattamento con i due antagonisti, EP 80317 e JMV 2959, che sono stati somministrati per via intraperitoneale (i.p.) due volte al giorno alla dose di 320 µg/kg per 7 giorni.

Durante tutto il periodo sperimentale (induzione dell'obesità e trattamento) sono stati monitorati quotidianamente sia il peso corporeo che il consumo giornaliero di cibo.

Il trattamento con EP 80317 ha determinato una riduzione significativa dell'aumento del peso corporeo nei topi alimentati con dieta HFD.

L'analisi microtomografica computerizzata con Skyscan 1176 ha consentito di quantificare la quantità di tessuto adiposo presente nei topi, permettendo di dimostrare che la riduzione dell'aumento del peso corporeo ben correlava con una minore deposizione di tessuto adiposo. Al termine dei trattamenti dopo un digiuno di 12 h è stato prelevato un campione di sangue per determinare i livelli di glicemia e di alcuni ormoni circolanti.

Nei topi obesi il valore della glicemia (140 mg/dl) era significativamente superiore rispetto a quello dei controlli (60 mg/dl) ma il trattamento con EP 80317 e JMV 2959 non modificava i valori di glicemia rispetto al gruppo di controllo. Anche i valori di insulina non risultavano alterati in seguito ad entrambi i trattamenti.

Considerata la correlazione tra obesità e insorgenza di diabete è importante considerare il ruolo svolto dalle incretine. Esse sono fattori endocrini rilasciati dall'intestino in risposta all'assunzione di nutrienti, in particolare i carboidrati che aumentano la secrezione di insulina e inibiscono il rilascio di glucagone in modo glucosio-dipendente; gli effetti insulinotropici si manifestano solo in presenza di valori glicemici > 90 mg/dl.

Fra le incretine abbiamo quindi determinato i livelli di *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1). Essi erano più elevati negli animali obesi (2.55 ng/ml) rispetto ai controlli



(1.04 ng/ml) e il trattamento con EP 80317 e JMV 2959 non variava in modo significativo i valori di GLP-1.

Quando i livelli di glucosio circolante sono elevati, il GLP-1 (prodotto dalle cellule K nel duodeno e digiuno prossimale) e il *Glucose-dependent Insulinotropic Peptide* (GIP, prodotto dalle cellule L dell'ileo e del colon) segnalano di aumentare il rilascio di insulina. Il GLP-1 è inoltre in grado di inibire la secrezione di glucagone, un ormone pancreatico la cui secrezione è aumentata in corso di diabete.

Inoltre, considerando che il ruolo del tessuto adiposo nella sindrome metabolica diviene sempre più rilevante per la continua scoperta di proteine di natura adipocitaria denominate "adipochine", abbiamo effettuato dosaggi dei livelli plasmatici di alcuni ormoni di questa famiglia.

Le adipochine esercitano un ruolo di primo piano nella regolazione della massa grassa influenzando il bilancio energetico, il metabolismo e la sensibilità all'insulina attraverso sia meccanismi di tipo endocrino/paracrino, sia mediante processi di angiogenesi, e di variazione delle dimensioni e del numero degli adipociti (*Matsuzawa et al, Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2006*). Esse esercitano inoltre un ruolo nel controllo della pressione arteriosa, del metabolismo delle lipoproteine, della coagulazione, dei processi immunitari e infiammatori. Nei topi obesi i livelli di leptina erano significativamente più elevati (3905.8 pg/ml) rispetto ai controlli (475.71 pg/ml) e il trattamento con JMV 2959 aumentava in modo significativo i livelli di leptina rispetto agli animali obesi ( $p < 0.05$ ; 8921.5 pg/ml).

Considerato il ruolo svolto da ghrelin sull'assunzione di cibo abbiamo misurato i livelli di tale ormone; essi risultano significativamente diminuiti nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi ma non risultano variati in seguito ad entrambi i trattamenti. Abbiamo inoltre dosato i livelli circolanti di Peptide YY (PYY), fattore che al contrario di ghrelin inibisce l'assunzione del cibo, e i risultati da noi ottenuti dimostrano che i trattamenti non inducono differenze significative nei valori di tale ormone nei differenti gruppi di animali.

Considerando anche l'associazione tra obesità e stato infiammatorio, come ben documentato dalle interazioni tra citochine, macrofagi, adipociti e cellule epiteliali (*Stephen D. Hursting, 2012*), abbiamo misurato mediante real-time PCR i livelli di mRNA del *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) e di *Monocyte Chemotactic*

*Protein-1* (MCP-1) nei depositi di grasso epididimale di topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso, i livelli di mRNA di TNF- $\alpha$  risultavano aumentati nei depositi adiposi epididimali dei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e tali valori diminuivano significativamente in seguito al trattamento con JMV 2959. I livelli plasmatici di MCP-1 erano aumentati nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e il trattamento con entrambi i composti portava ad una diminuzione anche se non significativa dei livelli di mRNA di MCP-1.

Il composto JMV 2959 ha quindi mostrato effetti protettivi nell'insorgenza dell'infiammazione. Per consolidare questo dato, sarebbe importante approfondire anche l'eventuale coinvolgimento di altre citochine coinvolte nell'infiammazione.

In conclusione possiamo affermare che il trattamento a breve termine con il composto EP 80317, antagonista del recettore GHS-R1a, si è dimostrato in grado di ridurre il peso corporeo degli animali.

Ulteriori studi a lungo termine saranno necessari per confermare l'effetto sull'andamento del peso corporeo.

## ***Introduzione***

## **CIRCUITO FAME-SAZIETA'**

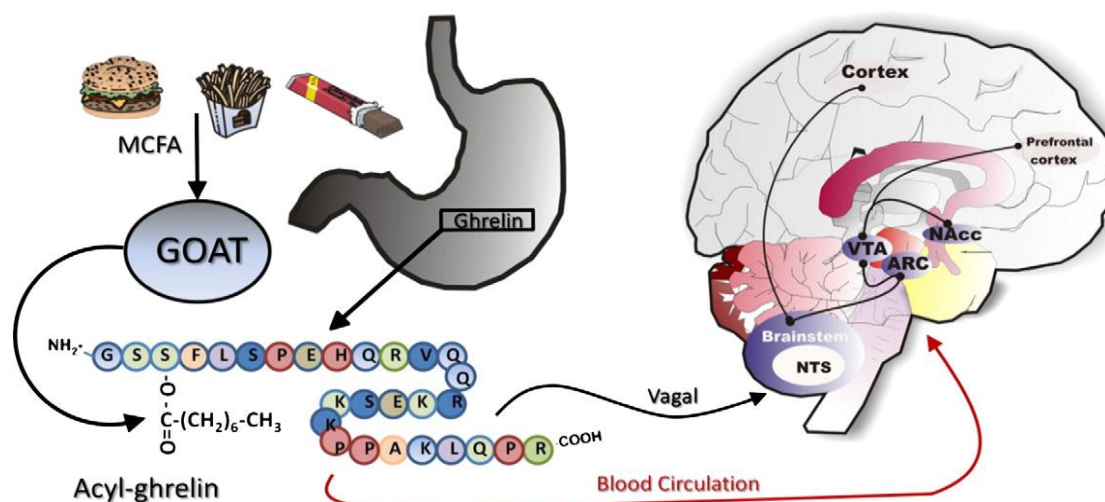
La regolazione dell'appetito è il risultato di un fine bilancio derivante dall'azione altamente integrata di diversi sistemi neurotrasmettitoriali in sinergia con sistemi ormonali periferici. Il desiderio di mangiare e la sensazione di sazietà che deriva dall'aver consumato un pasto sono aspetti del comportamento semplici e naturali ma che, se alterati, possono portare a situazioni patologiche (*Schwartz, Woods et al, 2000*). Tre sono le variabili che intervengono per determinare l'inizio, la fine e il volume del pasto: fame, appetito e sazietà. La fame è un fattore essenziale della sopravvivenza perchè è all'origine dei segnali che indicano il bisogno di mangiare e non è vincolata ad un determinato alimento. Viene descritta come "un buco allo stomaco", è accompagnata da contrazioni gastriche ed è spesso associata ad ansia, nervosismo e irritabilità. L'atto del mangiare promosso dalla fame è finalizzato a rimuovere la sofferenza fisica e mentale della mancanza di nutrimento. L'appetito esprime il desiderio di mangiare uno o più alimenti specifici per determinate esigenze biologiche o per piacere, accentuato da segnali di stimolazione sensoriale (visiva, olfattiva, uditiva, gustativa) provenienti dall'esterno, da condizionamenti ambientali, psicologici e familiari, che identificano il cibo con il piacere. La sensazione di "non fame" o di pienezza gastrica, varia gradualmente da uno stato di benessere fino alla comparsa di una sensazione spiacevole e di nausea verso un cibo abitualmente gradito a digiuno.

Il segnale di pienezza gastrica permette di interrompere il pasto in uno stadio di preassorbimento e compare già quando una quota modesta di cibo è stata assorbita. La quantità di cibo ingerito non dipende necessariamente e oggettivamente dalla mancanza di nutrienti, e quindi dalla fame, ma spesso il desiderio di mangiare un alimento, stimolato dalla sua vista o dal suo profumo, e quindi dall'appetito, può indurre l'uomo a introdurre una quantità molto elevata, addirittura eccessiva (*Berthoud, 2006*).

L'uomo è infatti l'unico animale capace di scegliere non solo in funzione delle disponibilità naturali, ma anche in relazione alla capacità di produrre quel determinato cibo e di prepararlo nel modo più gradito, cioè di cucinarlo.

La regolazione della fame è un fenomeno molto complesso. I meccanismi che l'organismo utilizza per regolare l'assunzione del cibo sono molteplici, e si

ammette l'esistenza di un sistema di regolazione altamente sofisticato, localizzato nel cervello (prevalentemente nell'ipotalamo) (Kalra et al, 2009). Tale sistema, che tende a mantenere un peso prefissato allo stesso modo di come altri centri regolano altre funzioni vitali, come temperatura corporea e respirazione, è descritto dal modello di Teitelbaum e Stellar, tuttora ritenuto valido (Teitelbaum e Stellar, 1954). Secondo questo modello, nell'ipotalamo vi sono due centri distinti che regolano la fame e la sazietà, il "Feeding Center" e il "Saziety Center". Il "Feeding center" è localizzato nel nucleo dell'ipotalamo laterale (LHA) e la sua eliminazione causa anoressia. Il "Saziety Center" è situato nel nucleo ventromediale (VMN) e nel nucleo paraventricolare (PVN) e la sua eliminazione determina obesità. Questi centri ipotalamici devono essere intesi come "reti nervose" che, in collegamento con altre strutture (corteccia cerebrale, sistema limbico, sistema nervoso autonomo), ricevono segnali da variabili esterne (ambientali) ed interne (Anand and Brobeck, 1951). Esisterebbe una fluttuazione della recettività dei neuroni verso queste sensazioni, legata allo stato della massa adiposa e quindi del peso corporeo. I segnali regolatori interni sono molteplici e comprendono fattori metabolici, quali i livelli ematici di glucosio (l'ipoglicemia stimola l'assunzione di cibo), di lipidi (i corpi chetonici e i prodotti catabolici degli acidi grassi deprimono l'assunzione) e di aminoacidi (triptofano), di vitamina B e di zinco, fattori ormonali di origine gastrica (peptidi bombesino simili), intestinale (colecistochinina), pancreatica (glucagone, insulina, amilina), fattori neurogenici, legati alla distensione gastrointestinale, e infine termostatici, relativi alla temperatura corporea. La zona del SNC coinvolta nell'omeostasi energetica è dunque l'ipotalamo, situato sotto il talamo e costituito da diversi nuclei coinvolti nei riflessi omeostatici. Il nucleo arcuato dell'ipotalamo rappresenta il centro di elaborazione primaria dell'informazione. Qui i diversi segnali arrivano attraversando la barriera emato-encefalica tramite *carriers* specifici, i quali vengono integrati tra loro originando una risposta che sarà poi inviata ai neuroni secondari. Il nucleo arcuato contiene due diversi set di neuroni: AgRP/NPY e POMC/CART. Tra di essi esiste una relazione di inibizione reciproca, per cui quando uno è attivo l'altro è inibito e viceversa (Stanley, Wynne et al. 2005). I segnali afferenti possono essere classificati in segnali di sazietà e segnali di appetito.



**Figura 1:** Schema dell'attivazione oressigenica di ghrelin e signalling (Schellekens et al, 2012).

Tra i segnali di appetito troviamo ghrelin, un ormone prodotto dallo stomaco prima dei pasti, che si lega ai recettori presenti sui neuroni AgRP/NPY attivandoli e antagonizzando così l'azione della leptina e dell'insulina, che costituiscono i segnali di sazietà (Andersson, Filipsson et al. 2004) (Kola, Hubina et al. 2005) (Figura1).

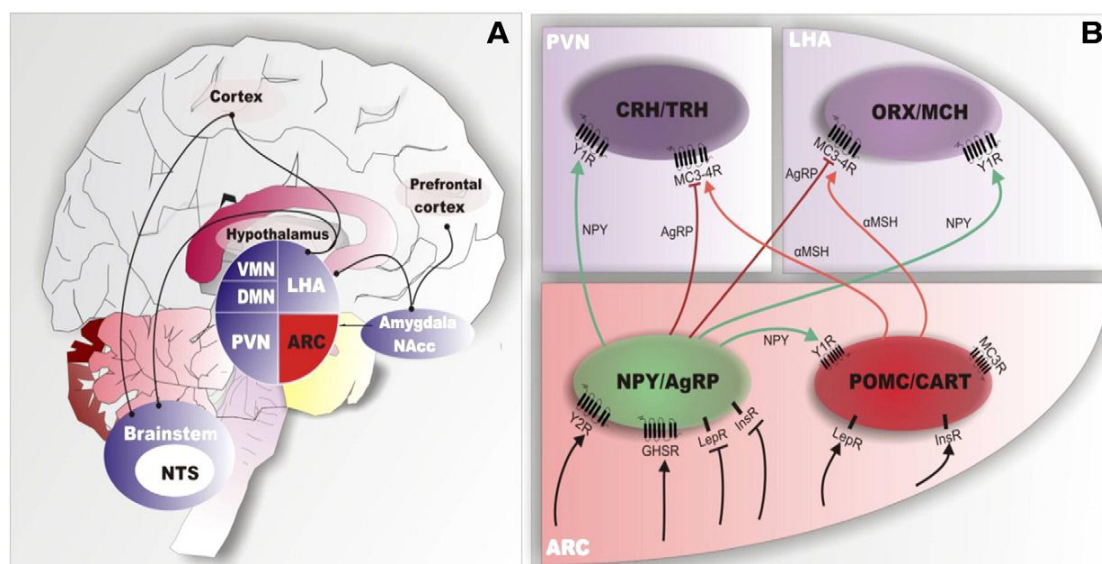
Questi due ormoni sono prodotti rispettivamente dal tessuto adiposo e dal pancreas in quantità proporzionali alle riserve energetiche e si legano ai recettori presenti sui due set di neuroni, inibendo AgRP/NPY e stimolando POMC/CART. Questi neuroni primari producono due classi di neuropeptidi, che hanno come target i neuroni secondari: neuropeptidi anoressigenici e oressigenici.

I primi sono prodotti dai neuroni POMC/CART che stimolati da segnali di sazietà inibiscono l'assunzione di cibo. Tra essi vi sono CART (*cocaine amphetamine regulated transcript*), così chiamato perché i suoi livelli aumentano in seguito ad assunzione di cocaina e amfetamine, e  $\alpha$ -MSH (*melanocyte stimulating hormone*), che deriva dal precursore POMC in seguito al suo processamento post-traduzionale. I neuropeptidi oressigenici sono invece prodotti dai neuroni AgRP/NPY in seguito a segnali di fame, stimolano l'assunzione di cibo e tra essi vi sono AgRP (*agouti related protein*), antagonista di  $\alpha$ -MSH, e NPY (neuropeptide Y). I nuclei VMN e PVN del centro della sazietà esprimono due tipi di recettori, il recettore della melanocortina di tipo 4 (MC4R) e il recettore per il neuropeptide Y (Y1R). Al primo si lega il neuropeptide  $\alpha$ -MSH con funzione inibitoria mentre il neuropeptide AgRP è un antagonista che si lega al recettore occupando il sito di

legame per  $\alpha$ -MSH, impedendo così l'inibizione di questi neuroni. Questi due neuropeptidi fanno parte del *pathway* della melanocortina. Il legame di NPY al recettore Y1R disinibisce questi neuroni.

Il centro che controlla l'appetito, situato nell'ipotalamo laterale, è costituito da due gruppi di neuroni: quelli che sintetizzano orexina e quelli che producono MCH (*melanin concentrating hormone*), due ormoni ad azione oressigenica. Entrambi i tipi neuronali sono espressi in modo uniforme all'interno del LHA e proiettano in diverse zone del cervello in cui si trovano i recettori per i rispettivi ormoni. L'azione su questi target determina salivazione, motilità gastrica e secrezione di insulina e glucagone (ormoni pancreatici), che spingono alla ricerca di cibo (*Minokoshi, Alquier et al. 2004*). I neuroni orexina e MCH ricevono diversi input. I primi sono attivati dal nucleo del tratto solitario con cui fanno sinapsi e dai neuroni NPY del nucleo arcuato. Questi ultimi attivano anche i neuroni MCH. Esiste un *crosstalk* tra i due gruppi di neuroni e, in particolare, sembra che i neuroni orexina siano in grado di influenzare l'espressione di MCH attraverso meccanismi diretti e indiretti (Figura 2).

L'adiponectina, ormone di derivazione adipocitica, è in grado di controllare il metabolismo energetico di lipidi e carboidrati e modulare l'effetto dell'insulina. Essa svolge azione antiaterogena ed anti-infiammatoria, e il suo livello è inversamente correlato all'obesità e all'insulino-resistenza (*Scherer et al 1995*). Nei soggetti affetti da coronaropatia vi sono bassi livelli plasmatici di adiponectina, analogamente a quanto riscontrato in altre condizioni di rischio cardiovascolare, quali sesso maschile, ipertensione arteriosa, obesità e diabete mellito di tipo 2. L'ormone PYY3-36 è invece prodotto dalle cellule della mucosa intestinale dopo i pasti e in proporzione alla loro quantità. Si lega al recettore Y2R espresso sui neuroni AgRP/NPY e determina il senso di appagamento dopo i pasti (*Batterham et al 2002*). Infine vi sono altri due ormoni: colecistochinina (CCK) e *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), entrambi prodotti dall'intestino e dal duodeno, che stimolano il nervo vago a livello locale. Il nervo vago parte dal cervello e innerva l'intestino, lo stimolo viene inviato al SNC nel nucleo del tratto solitario, che sinapta con i nuclei LHA (area ipotalamica laterale) e PVN (paraventricolare) determinando una diminuzione dell'assunzione di cibo.



**Figura 2:** **A** Coinvolgimento dell'ipotalamo nella regolazione dell'appetito. **B** Segnali periferici che regolano assunzione di cibo e interazione con i recettori espressi (Schellekens et al, 2012).

La fame e la sazietà sono quindi il risultato di processi fisiologici complessi. L'appetibilità è proporzionale al piacere che si prova quando si mangia un determinato alimento. Essa dipende dalle proprietà sensoriali del cibo come, ad esempio, il sapore. Gli alimenti dolci e ricchi di grassi esercitano un'innequivocabile attrattiva sensoriale e suscitano gratificanti effetti post-ingestione, che prendono il nome di "risposta di piacere". Il cibo, infatti, non è unicamente una fonte di nutrimento ma è spesso consumato per il piacere che procura.

I livelli di espressione di POMC riflettono lo stato energetico dell'organismo: sono infatti molto bassi negli animali a digiuno e aumentano con l'introduzione di cibo. Inoltre nell'uomo mutazioni nel gene POMC o modificazioni del suo processamento sono associati a insorgenza di obesità e insufficienza surrenale (Krude, Biebermann et al. 1998) (Swart, Jahng et al. 2002). CART è coespresso con  $\alpha$ -MCH nell'ARC. La somministrazione intracerebroventricolare di questo peptide inibisce l'assunzione di cibo, anche stimolata da NPY, ma l'iniezione di CART nell'ARC e in altri nuclei ipotalamici aumenta l'assunzione di cibo; questo ha portato ad ipotizzare l'esistenza di più di una popolazione neuronale esprimente CART con ruoli differenti nella regolazione dell'assunzione di cibo (Dhillon, Small et al. 2002). NPY è il più potente agente oreosizzante tra quelli conosciuti ed è uno dei più abbondanti neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale. AgRP è un antagonista dei recettori MC3-R e MC4-R che svolgono un ruolo importante



nell'omeostasi energetica ed è in grado di contrastare l'anoressia indotta da  $\alpha$ -MSH e aumentare il peso corporeo diminuendo la spesa energetica (Rossi, Kim et al. 1998). NPY e AgRP sono colocalizzati nel 90% dei neuroni del nucleo arcuato (Hahn, Breininger et al. 1998); la stimolazione di questi neuroni produce quindi un incremento nell'assunzione di cibo. Topi knock-out per NPY/AgRP non hanno però delle alterazioni nell'assunzione di cibo o nel peso corporeo (Broberger, Johansen et al. 1998) ad indicare la ridondanza del sistema di regolazione del bilancio energetico. L'ARC elabora e proietta le informazioni ricevute verso altri nuclei ipotalamici come LHA/PFA (area perifornicale) e il nucleo paraventricolare (PVN) che contribuiscono all'integrazione del segnale. La somministrazione nel PVN di quasi tutti i peptidi anoressizzanti e oressizzanti conosciuti modifica l'assunzione di cibo (Kalra, Dube et al. 1999). Lavori recenti suggeriscono che tali peptidi agiscano attraverso la via di trasduzione del segnale che coinvolge AMPK (*AMP-activated protein kinase*). AMPK è una proteina attivata dallo stress che diminuisce le riserve di ATP della cellula e regola il metabolismo cellulare inibendo le vie metaboliche che consumano ossigeno e stimolando quelle che producono ATP (Hardie, Scott et al. 2003). Inoltre AMPK regola il metabolismo energetico attraverso la modificazione dell'espressione di composti oressizzanti e anoressizzanti nell'ipotalamo. L'attivazione di AMPK induce un aumento dell'mRNA di NPY e AgRP in topi a digiuno, suggerendo che AMPK amplifichi i segnali oressizzanti in uno stato di digiuno, mentre in condizioni di normale alimentazione contribuisce a spegnere tali segnali (Minokoshi, Alquier et al. 2004). Ormoni anoressizzanti come leptina e insulina inibiscono l'attività ipotalamica di AMPK (Minokoshi, Alquier et al. 2004), mentre composti oressizzanti come ghrelin e i cannabinoidi ne stimolano l'attività (Andersson, Filipsson et al. 2004) (Kola, Hubina et al. 2005). L'attivazione di AMPK aumenta l'assunzione di cibo e il peso corporeo mentre la soppressione della sua attività diminuisce questi parametri (Xue and Kahn 2006). Le aree LHA/PFA contengono neuroni che esprimono MCH e pre-pro-orexina. L'iniezione intracerebroventricolare di MCH induce un aumento dell'assunzione di cibo (Qu, Ludwig et al. 1996) e dei depositi adiposi nel ratto (Marsh, Weingarth et al. 2002), mentre la pre-pro-orexina viene rilasciata come orexina A e orexina B, due peptidi che rivestono un ruolo sia nella regolazione del metabolismo energetico sia nei meccanismi di risveglio e attenzione. Infatti nel

topo in condizioni di deprivazione di cibo, le orexine inducono il risveglio per stimolare la ricerca e l'assunzione di cibo (*Wynne, Stanley et al. 2005*).

L'ipotalamo invia e riceve informazioni anche dal tronco encefalico, soprattutto il nucleo del tratto solitario (NTS). Come l'ipotalamo, anche il NTS può ricevere informazioni dalla periferia relative allo stato energetico dell'organismo grazie alla sua vicinanza anatomica ad una struttura con una barriera emato-encefalica incompleta, l'area postrema (*Ellacott and Cone 2004*). Il NTS riceve anche le afferenze del nervo vago dal tratto gastrointestinale e dei nervi glossofaringei. Il NTS contiene popolazioni neuronali che esprimono NPY, melanocortine e GLP-1; quest'ultimo peptide costituisce il principale circuito neuronale coinvolto nella regolazione dell'assunzione di cibo del tronco encefalico (*Lopez, Tovar et al. 2007*). Nel sistema nervoso centrale il GLP-1 è sintetizzato solo dai neuroni del NTS; la sua somministrazione nel terzo e nel quarto ventricolo riduce l'assunzione di cibo, anche indotta da NPY (*Turton, O'Shea et al. 1996*).

Il sistema nervoso enterico e gli ormoni prodotti dagli organi del tratto gastrointestinale sono principalmente coinvolti nella regolazione a breve termine dell'assunzione di cibo controllando l'inizio e la conclusione del pasto. Il sistema nervoso enterico, attraverso il nervo vago e le terminazioni nervose del sistema nervoso simpatico, trasmette informazioni al NTS, all'ARC e al PVN riguardo la distensione e la contrazione delle pareti di stomaco e intestino, la presenza di nutrienti nel lume intestinale e il rilascio di ormoni e neurotrasmettitori; l'integrazione di questi segnali afferenti regola la quantità di cibo assunta da un individuo (*Konturek, Konturek et al. 2004*). Tra gli ormoni prodotti nel tratto gastrointestinale, ghrelin sembra essere quello maggiormente coinvolto nell'inizio del pasto, mentre PYY (peptide YY), CCK (colecistochinina) e GLP-1 sono peptidi anoressizzanti. Ghrelin è prodotta principalmente dalle cellule ossintiche dello stomaco. I livelli plasmatici di ghrelin nell'uomo sono elevati durante il digiuno, con un picco prima dell'inizio del pasto, e diminuiscono dopo l'introduzione di alimenti; inoltre la somministrazione centrale o periferica di ghrelin nel ratto stimola l'assunzione di cibo e la deposizione di tessuto adiposo (*Wren 2001 e Tschop 2000*). L'azione di ghrelin sul *food intake* è probabilmente mediata dai neuroni dell'ARC secernenti NPY/AgRP. Topi knock-out per ghrelin o per il suo recettore hanno appetito normale e non mostrano alterazioni fenotipiche, suggerendo che ghrelin non svolga un ruolo fondamentale per la determinazione

della composizione corporea (Sun, Wang et al. 2004). L'ingestione di cibo induce il rilascio da parte delle cellule endocrine dell'intestino di peptidi mediatori del segnale di sazietà in grado di attivare le fibre nervose del sistema nervoso enterico e di entrare nel circolo sanguigno e raggiungere le strutture nervose centrali; insieme alla distensione delle pareti gastriche, questi peptidi trasmettono la percezione di pienezza delle strutture gastrointestinali, promuovendo la fine del pasto (Cummings and Overduin 2007). Uno dei primi ormoni di questo sistema ad essere identificato è stata la CCK; questo peptide è prodotto principalmente dalle cellule I del digiuno e del duodeno, oltre che nel sistema nervoso centrale ed enterico dove agisce come neurotrasmettitore coinvolto nella regolazione del comportamento alimentare e nella memoria (Crawley and Corwin 1994). La CCK riduce la durata del pasto e la quantità di alimenti introdotta sia nell'uomo sia nell'animale, agendo sia con meccanismi autocrino-paracrini (azione sulle terminazioni del nervo vago) sia neuroendocrini; essa è infatti in grado di passare la barriera emato-encefalica e interagire con i propri recettori presenti soprattutto nel NTS e nel nucleo dorso-mediale dell'ipotalamo (Stanley, Wynne et al. 2005) (Lopez, Tovar et al. 2007). Le cellule L dell'intestino producono invece PYY e GLP-1. La secrezione di questi peptidi è bifasica, con una prima fase di rilascio immediatamente dopo l'assunzione di cibo, ancora prima che il cibo giunga nell'intestino, e successivamente per diretta stimolazione dei nutrienti; inoltre entrambi rallentano il tempo di svuotamento gastrico, contribuendo all'"ileal brake". L'ileal brake è un meccanismo a feed-back attraverso il quale gli alimenti ingeriti attivano dei segnali nell'intestino distale che inibiscono la motilità del tratto gastrointestinale prossimale e lo svuotamento gastrico. Esso è mediato da meccanismi nervosi e da peptidi implicati nei meccanismi di sazietà, come GLP-1 e PYY, oltre che da un blocco comportamentale all'ulteriore introduzione di cibo (Strader and Woods 2005) (Pironi, Stanghellini et al. 1993). PYY appartiene alla famiglia di NPY ed esiste principalmente in due forme, PYY<sub>1-36</sub> e PYY<sub>3-36</sub>. PYY<sub>3-36</sub> esplica un'azione anoressizzante e la sua somministrazione causa una riduzione dell'assunzione di cibo sia nell'uomo sia negli animali da laboratorio (Batterham, Cowley et al. 2002) (Batterham and Bloom 2003) (Challis, Pinnock et al. 2003). Gli individui obesi hanno bassi livelli di PYY<sub>3-36</sub> a digiuno e i livelli post-prandiali aumentano di poco, ma l'infusione del peptide induce una riduzione nell'assunzione di cibo pari al 30%, del tutto paragonabile a quella ottenibile nel

gruppo di soggetti normopeso (31%) (Batterham, Cohen et al. 2003). Oltre che nel NTS, il GLP-1 è prodotto nell'intestino a partire dal proglucagone, che subisce un taglio tessuto-specifico a dare GLP-1, oxintomodulina e GLP-2. IL GLP-1, così come l'oxintomodulina, riduce l'assunzione di cibo in modo dose-dipendente, anche se, quando l'infusione raggiunge la concentrazione post-prandiale, l'effetto è modesto. Sembra che i soggetti obesi abbiano ridotti livelli plasmatici di GLP-1, ma una normale risposta al peptide; la somministrazione di GLP-1 prima del pasto riduce del 15% le calorie introdotte (Naslund, King et al. 2004): una ridotta secrezione di questo peptide potrebbe quindi esser coinvolta nella patogenesi dell'obesità. Topi knock-out per il recettore per GLP-1 hanno un normale peso corporeo e una regolare assunzione di cibo: il ruolo di GLP-1 nella regolazione del *food-intake* resta quindi ancora controverso.

I componenti neuro-ormonali provenienti dal tratto gastro-intestinale sono quindi implicati nella regolazione a breve termine dell'assunzione di cibo; questo è però solo un aspetto dell'omeostasi energetica, un processo di regolazione attiva che comprende anche la stabilità delle riserve di energia dell'organismo depositata come tessuto adiposo (regolazione a lungo termine). I due principali ormoni coinvolti nella regolazione a lungo termine delle riserve energetiche sono la leptina e l'insulina, entrambi dotati di attività anorressizzante. L'insulina, prodotta dalle cellule beta-pancreatiche, è stata uno dei primi segnali di adiposità ad essere descritto. La sua concentrazione plasmatica dipende dalla sensibilità periferica all'insulina stessa, che a sua volta risulta correlata ai depositi corporei di tessuto adiposo e alla loro distribuzione anatomica, dipendendo in modo particolare dai depositi di tessuto adiposo addomino-viscerale (Porte, Baskin et al. 2002). I livelli circolanti di insulina influenzano anche il trasporto del peptide attraverso la barriera emato-encefalica, in quanto mediato da un trasportatore saturabile (Baura, Foster et al. 1993). La somministrazione centrale di insulina diminuisce l'assunzione di cibo e il peso corporeo, probabilmente per azione sul sistema del NPY e delle melanocortine (Stanley, Wynne et al. 2005). La leptina è prodotta principalmente dagli adipociti bianchi; i suoi livelli plasmatici riflettono sia lo stato delle riserve energetiche dell'organismo sia lo stato del bilancio energetico in acuto. La leptina può attraversare la barriera emato-encefalica con un sistema di trasporto saturabile, probabilmente mediato dalla forma solubile del suo recettore (El-Haschimi, Pierroz et al. 2000). A livello del sistema nervoso centrale la leptina

agisce soprattutto inibendo i neuroni NPY/AgRP e attivando i circuiti neuronali di POMC/CART del ARC. La concentrazione di leptina nel plasma è strettamente correlata alla massa adiposa e diminuisce in condizioni di restrizione di cibo (Maffei, Halaas et al. 1995). La somministrazione centrale e periferica di leptina riduce l'assunzione di cibo, tale effetto persiste quando la somministrazione è ripetuta cronicamente con conseguente calo del peso corporeo (Halaas, Gajiwala et al. 1995) (Ahima 2000). La mancanza di leptina o del suo recettore funzionale (Ob-Rb) nel topo, generando i topi *ob/ob* e *db/db*, ha notevoli effetti sull'animale, inducendo iperfagia e obesità, oltre ad altre modificazioni neuro-endocrine. Anche nell'uomo il deficit di leptina o del suo recettore provoca obesità e ipogonadismo, ma i casi sono molto rari. Nei soggetti obesi i livelli circolanti di leptina sono molto elevati, ma si osserva una insensibilità all'azione del peptide, tanto che si parla di leptino-resistenza (Lopez, Tovar et al. 2007) (Stanley, Wynne et al. 2005). Leptina e insulina svolgono anche un ruolo nella regolazione a breve termine del metabolismo energetico, potenziando la sensibilità delle strutture del sistema nervoso centrale ai segnali di sazietà, come ad esempio la CCK e il GLP-1 (Schwartz, Woods et al. 2000) (Morton, Cummings et al. 2006). Recettori per la leptina e l'insulina sono stati identificati sulle cellule L dell'intestino e la loro attivazione induce un aumento nel rilascio di GLP-1 (Anini and Brubaker 2003).

La regolazione del metabolismo energetico e il mantenimento del peso corporeo sono quindi regolati da numerosi circuiti neuronali e periferici complessi e ridondanti. La ricerca e lo sviluppo di nuovi composti efficaci per la riduzione del peso corporeo sono dunque molto complicati, poiché l'azione su un singolo target potrebbe essere resa vana da meccanismi compensatori. La ricerca futura dovrebbe quindi essere orientata verso terapie combinate mirate a bersagli centrali e periferici.

## **CIRCUITO GRATIFICAZIONE-PIACERE**

Il piacere è uno dei fattori chiave che contribuiscono, nell'uomo, al controllo dei comportamenti motivati. Inteso come il complesso delle sensazioni che conseguono all'appagamento dei bisogni, è stato ed è tuttora un elemento indispensabile per la vita, che ha permesso l'evoluzione degli animali e dell'uomo. Il più importante e noto tra i circuiti di gratificazione cerebrale è rappresentato dal sistema limbico, implicato nella genesi delle emozioni e nei processi di apprendimento e memoria. Classicamente si considera che questo sistema sia costituito dalle seguenti strutture: cortex prefrontale, ippocampo, ipotalamo, talamo. Al suo interno si trovano alcuni nuclei fondamentali come l'abenua, l'amigdala, e i nuclei dorsale (i gangli della base) e ventrale (nucleo accumbens, formato da una parte detta *core* e una parte detta *shell*).

I centri cerebrali che controllano i meccanismi della gratificazione furono identificati nel 1954 da James Olds e Peter Milner (*Olds e Milner, 1954*), che osservarono come l'autostimolazione elettrica, tramite comportamento volontario e operante sulle aree cerebrali del sistema limbico, potesse dar luogo a un forte stimolo gratificante. Nei decenni successivi si è visto come facciano parte del sistema della gratificazione anche altre componenti fondamentali: il sistema neurotrasmettitoriale dopaminergico mesolimbico, che sembrerebbe controllare la spinta motivazionale per la ricerca dello stimolo gratificante; il sistema neurotrasmettitoriale oppioide, che medierebbe i processi di gratificazione conseguenti al consumo della sostanza; il sistema glutaminergico, che modula il rilascio della dopamina in alcune aree cerebrali; e il sistema gabaergico, che inibisce il rilascio di dopamina a livello del sistema nervoso centrale.

Il sistema dopaminergico, costituito da un complesso di neuroni che utilizzano come neurotrasmettitore la dopamina, origina a livello di due nuclei del tronco encefalico, A9 e A10. Dal nucleo A9 partono le proiezioni verso caudato e putamen, aree che controllano il movimento. Dal nucleo A10 (area ventrotegmentale o VTA) partono le proiezioni verso una struttura complessa denominata amigdala estesa, che comprende il sistema mesolimbico (formato dal nucleo accumbens, la stria terminale, il tubercolo olfattorio) e il sistema mesocorticale (formato da aree della corteccia che controllano le funzioni cognitive). Il sistema oppioide è rappresentato da un complesso di neuroni che

utilizza come neurotrasmettitori i neuropeptidi oppioidi: endorfine, enkefaline e dinorfine. Il circuito della gratificazione appare molto complesso e si integra con varie regioni cerebrali, che sappiamo essere necessarie per caratterizzare emotivamente le esperienze e per dirigere emotivamente la risposta dell'individuo verso attività piacevoli quali assunzione di cibo e interazioni sociali. L'amigdala, per esempio, è il centro della memoria emotiva e dell'apprendimento. Aiuta a valutare se un'esperienza è piacevole o sgradevole, quindi se va ripetuta o evitata, e a formare connessioni tra un'esperienza e altri segnali. Il talamo, che secreta il *corticotropin releasing factor* (CRF), aiuta a mantenere l'omeostasi del metabolismo corporeo in rapporto agli stimoli ambientali. L'ippocampo contribuisce alla registrazione del ricordo di un'esperienza, compreso dove, quando e con chi si è verificata, e contribuisce alla creazione della memoria cosciente. Semplificando, maggiore è il rilascio di dopamina, maggiore è la gratificazione e più facile diventa la memorizzazione del ricordo nell'ippocampo. Le regioni frontali della corteccia, sede anche della memoria cosciente e della memoria a lungo termine, coordinano ed elaborano le informazioni relative all'esperienza determinando il comportamento finale di ogni individuo.

La via dopaminergica mesolimbica, che collega l'area segmentale ventrale al nucleo accumbens, opera come una sorta di interruttore della gratificazione, segnalando agli altri centri cerebrali quanto è piacevole una certa attività. Più alta è la gratificazione, più è possibile che l'organismo registri e memorizzi l'azione e la ripeta. Questo circuito neuronale, che si attiva anche nelle fasi di apprendimento e di stabilizzazione dei comportamenti di dipendenza dovuti alle sostanze, ma anche nel gioco d'azzardo patologico e nella *sex addiction*, è coinvolto in alcune patologie psichiatriche come il disturbo ossessivo-compulsivo, il deficit motivazionale nella depressione e nel morbo di Alzheimer e le reazioni comportamentali all'attaccamento (Nestler et al., 2001).

La tendenza verso l'obesità è direttamente collegata a questo sistema, il cui studio ha dimostrato l'esistenza di un incremento di livelli di dopamina extracellulare e dei suoi metaboliti all'interno del nucleo accumbens dopo l'ingestione di cibo altamente appetitoso. Recentemente (Geiger et al. 2009) è stato dimostrato un legame tra predisposizione all'obesità e deficit di dopamina nel sistema mesolimbico in animali da laboratorio. L'idea che la diminuzione di dopamina porti a un aumento del consumo di cibi ipercalorici e appetibili è compatibile con

studi effettuati sull'uomo (*Wang et al., 2001*), dove si è visto che negli individui obesi i livelli dei recettori della dopamina D2 sono significativamente ridotti. Farmaci psicoattivi quali la marijuana, l'etanolo ma anche stimoli piacevoli o cibi gustosi, sono noti indurre il rilascio di dopamina in specifiche regioni cerebrali. Il sistema endocannabinoide partecipa alla modulazione dei circuiti del piacere e la manipolazione di questo sistema è in grado di influenzare i comportamenti legati alla gratificazione. L'elevata espressione di recettori CB1 in aree coinvolte nel piacere costituisce una forte indicazione del diretto coinvolgimento del sistema nelle diverse funzioni psicologiche regolate da queste regioni del cervello, incluso l'appetito. Vi è quindi una forte correlazione tra i livelli limbici di endocannabinoidi e di dopamina e l'aumento del desiderio per il cibo gustoso.

### ***FATTORI ENDOCRINI E NEUROENDOCRINI: LA REGOLAZIONE DELL'ASSUNZIONE DI CIBO***

Segnali a breve e lungo termine provenienti dalla periferia agiscono sul sistema nervoso centrale per regolare il bilancio energetico. Il sistema di regolazione a breve termine svolge la funzione di prevenire un'eccessiva introduzione di cibo mentre il sistema di regolazione a lungo termine è principalmente coinvolto nel mantenimento di adeguate riserve energetiche sotto forma di tessuto adiposo. La principale struttura nervosa coinvolta è l'ipotalamo, in modo particolare il nucleo arcuato (ARC).

### ***FATTORI SENSORIALI***

L'assunzione di cibo può provocare una sensazione piacevole e gratificante che può indurre il soggetto ad alimentarsi anche in mancanza di un deficit di energia. Questa sensazione è comunque influenzata anche dallo stato energetico dell'organismo, infatti la palatabilità di un alimento cambia se il soggetto è affamato o sazio. Dopo il pasto, quando i segnali di sazietà sono presenti, le proprietà sensoriali del cibo non vengono più percepite come piacevoli e non si avverte più la sensazione di appetito. L'integrazione tra segnali di sazietà e segnali sensoriali, che includono la vista, il profumo e il gusto di un alimento, avviene a livello della corteccia orbitofrontale. I neuroni presenti in questa regione cerebrale



determinano quanto gradevole è un alimento, ma solo se il soggetto ha appetito per tale alimento. La corteccia orbitofrontale è in comunicazione con l'ipotalamo a cui invia le informazioni sensoriali e dal quale riceve i segnali di fame/sazietà dell'organismo (Rolls 2006) (Rolls 2005).

Il circuito neuronale responsabile della genesi di queste sensazioni è molto complesso e coinvolge diversi sistemi di segnale, come gli oppioidi, gli endocannabinoidi e il sistema dopaminergico. Un ruolo molto importante è svolto anche dal nucleo accumbens; la somministrazione di agonisti oppioidi e agonisti dopaminergici in questa regione stimola l'ingestione di cibi gratificanti come saccarosio e grassi (Zhang, Balmadrid et al. 2003).

La quantità e la qualità di cibo ingerite in un pasto dipende anche da un meccanismo definito "sazietà sensoriale-specifica", cioè dalla diminuzione dell'appetito per un cibo particolare durante il pasto, senza perdita dell'appetito per altri alimenti; questo garantisce l'apporto di tutti i nutrienti necessari durante il pasto. La disponibilità di un numero sempre crescente di alimenti può portare a introdurre più cibo rispetto alle esigenze dell'individuo durante il pasto e nel lungo termine ad un progressivo aumento ponderale (Rolls, Van Duijvenvoorde et al. 1983).

Negli ultimi anni inoltre gli stimoli prodotti dal gusto, dal profumo e dall'aspetto del cibo e la sua disponibilità sono notevolmente aumentati, mentre i segnali di sazietà prodotti dalla distensione gastrica o dagli ormoni del tratto gastrointestinale sono rimasti invariati; questo si traduce in una maggior rilevanza della palatabilità del cibo rispetto ai segnali di sazietà e quindi in una tendenza alla eccessiva introduzione di cibo (Rolls 2007).

## **IL FEEDBACK POSITIVO PERIFERICO: I SEGNALI DELLA FAME**

### **GHRELIN E I GROWTH HORMONE SECRETAGOGUES (GHS)**

Ghrelin è un peptide di 28 amminoacidi in cui la serina in posizione 3 è esterificata con acido n-ottanoico, una modificazione essenziale per la sua attività biologica. Questa molecola è stata identificata inizialmente come il ligando endogeno del recettore per i GHS (*growth hormone secretagogues*), il GHS-R1a, espresso principalmente nell'ipotalamo e nell'ipofisi.

Ghrelin è prodotta principalmente nello stomaco, in particolare nelle cellule endocrine della ghiandola ossintica a livello del fondo gastrico, ma anche in altri tessuti come l'ipofisi, l'ipotalamo, l'intestino, la placenta, il fegato, il cuore, la tiroide, le cellule del sistema immunitario (cellule B, T e neutrofili), le cellule beta del pancreas, il polmone, l'ovaio e alcuni tessuti neoplastici (*De Ambrogi, Volpe et al. 2003*). Quest'ampia distribuzione suggerisce che ghrelin abbia diverse attività biologiche oltre alla stimolazione del rilascio dell'ormone della crescita (GH, *growth hormone*); infatti è in grado di regolare la motilità e la secrezione acida gastrica, la secrezione pancreatica, il metabolismo dei lipidi e dei carboidrati, esercita attività cardiovascolari e soprattutto stimola l'assunzione di cibo e favorisce il deposito del tessuto adiposo.

### **Osservazioni storiche**

La storia dei GHS ha inizio nel 1976 quando il gruppo di Bowers identificò una molecola di natura peptidica derivata dalla met-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH<sub>2</sub>), priva dell'attività oppioide, ma in grado di stimolare la secrezione di GH da cellule ipofisarie in coltura. Successivamente mediante studi di computer modelling, vennero sviluppate nuove molecole peptidiche e non peptidiche in grado di stimolare la secrezione di GH con una potenza maggiore (*Bowers, Momany et al. 1984*), (*Lengyel 2006*).

L'identificazione nel 1982 da parte di Guillemin e River dello stimolatore fisiologico del GH, il GHRH, oscurò in parte l'interesse della comunità scientifica per i GHS. Tuttavia, gli scarsi risultati ottenuti con la terapia con GHRH rinnovarono l'interesse per i GHS (*Guillemin, Brazeau et al. 1982*).

Nel 1984 venne sintetizzato il primo esapeptide in grado di rilasciare significative quantità di GH sia *in vivo* che *in vitro*: il GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>). L'attività GH-rilasciante del GHRP-6 è stata ampiamente dimostrata in molte specie animali, tra cui anche l'uomo; tale attività si manifesta in modo dose-dipendente e dopo somministrazione per via endovenosa, sottocutanea, intranasale e, nonostante la bassa biodisponibilità e la breve emivita, anche per via orale (*Bowers, Momany et al. 1984*). L'efficacia per via orale è probabilmente dovuta alla presenza di aminoacidi in forma D nelle posizioni 2 e 5, che conferiscono alla molecola una certa resistenza all'azione delle endopeptidasi

(Walker, Codd et al. 1990). Nel tentativo di ottenere molecole dotate di una maggiore biodisponibilità e di una emivita più lunga vennero sintetizzati numerosi analoghi peptidici, tra cui GHRP-1 (Ala-His-D-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), il GHRP-2 (D-Ala-D-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) e hexarelin (His-D-2-Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), quest'ultimo dotato di maggiore lipofilità e maggiore resistenza alla degradazione enzimatica rispetto al GHRP-6 (Deghenghi, Cananzi et al. 1994),(Wu, Chen et al. 1994),(Ghigo, Arvat et al. 1994).

La famiglia dei GHS comprende anche peptidi ciclici: il pentapeptide (G-7039), il tetrapeptide (G-7134), lo pseudotripeptide (G-7502) e l'eptapeptide rigido (G-7203) (McDowell, Elias et al. 1995), (Deghenghi 1996).

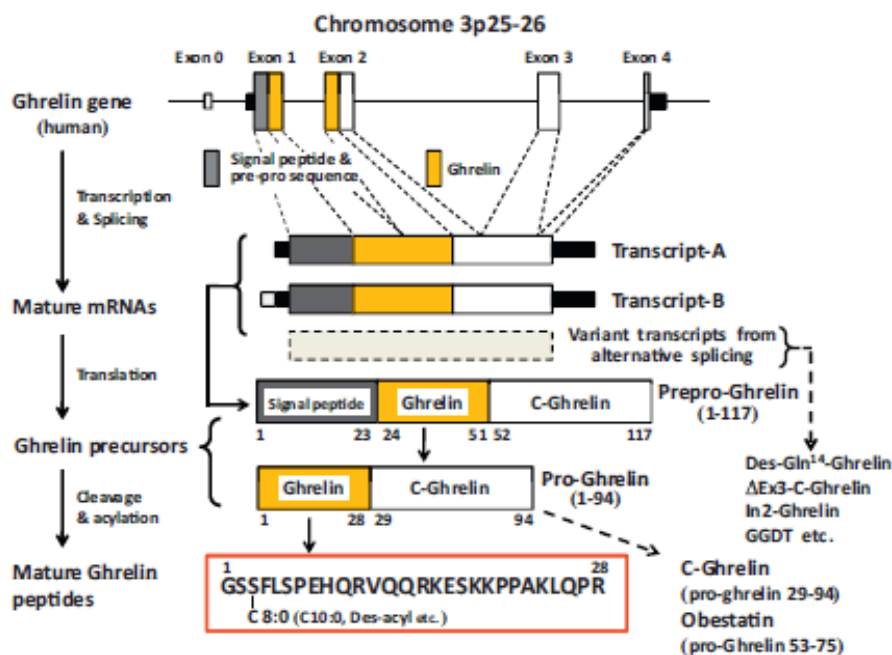
Successivamente, per aumentare la biodisponibilità orale dei GHS, vennero sintetizzate nuove molecole di natura non peptidica, quali il composto benzolattamico L-692,429 (Cheng, Chan et al. 1993) il suo derivato 2-idrossipropilico L-692,585 (Jacks, Hickey et al. 1994) ed il composto L-163,191 (MK-0677) (Patchett, Nargund et al. 1995) tutte dotate di una potente attività GH-rilasciante e di una migliore resistenza alla degradazione enzimatica. Il composto più rappresentativo dei GHS sintetici non peptidici è la spiroindolina L-163,191 (MK-0677) che presenta un'elevata biodisponibilità e un effetto duraturo: è infatti in grado di aumentare la secrezione di GH per 24 ore, a seguito di una singola somministrazione orale (Arvat 2002).

Gli studi effettuati con MK-0677 fornirono un contributo significativo allo studio dei GHS e di ghrelin in quanto permisero di identificare e clonare il gene per il GHS-R, un nuovo GPCR a sette domini transmembrana (Howard, Feighner et al. 1996).

Tre anni più tardi, nel 1999, il lavoro di Kojima permise infine di identificare il ligando endogeno per questo recettore orfano: ghrelin, un ormone secreto prevalentemente a livello dello stomaco, seppur presente in piccole quantità anche nell'ipotalamo (Kojima, Hosoda et al. 1999).

Zhang e collaboratori, confrontando le sequenze dei peptidi pre-proghrelin appartenenti a 11 specie di mammifero differenti, hanno notato l'esistenza di una regione altamente conservata e fiancheggiata da siti potenziali di taglio enzimatico, da cui si origina un nuovo peptide di 23 aa, espresso negli stessi tessuti in cui è espresso ghrelin, in particolare nello stomaco. In virtù delle sue azioni inibitorie su assunzione di cibo, peso corporeo, tempo di svuotamento

gastrico e motilità intestinale, questo peptide fu denominato “obestatin” (Zhang, Ren et al. 2005) (Figura 3).



**Figura 3:** Struttura del gene umano di ghrelin e suoi derivati (Nishi et al 2011).

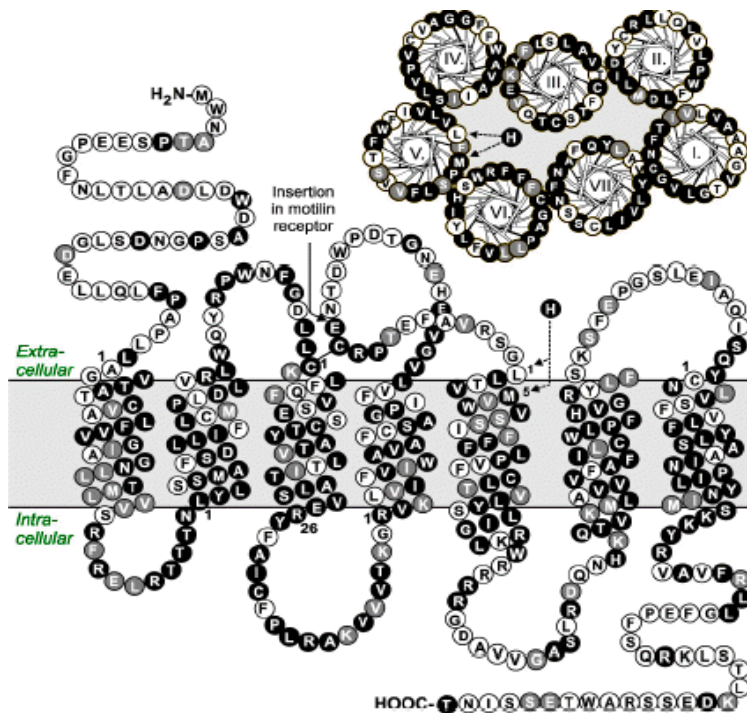
L'aspetto interessante della scoperta è che due peptidi derivanti da uno stesso precursore abbiano proprietà antitetiche. Infatti, contrariamente a quanto osservato per ghrelin, obestatin, somministrata per via periferica o centrale è in grado di inibire in modo dose-dipendente nel topo e nel ratto l'assunzione di cibo, l'aumento ponderale, la motilità e il transito intestinale (Zhang, Ren et al. 2005). A differenza di ghrelin, obestatin tuttavia non influenza la secrezione di GH (Bresciani, Rapetti et al. 2006), (Nogueiras, Pfluger et al. 2007), (Yamamoto, Ikeshita et al. 2007) e i livelli plasmatici di obestatin non vengono modificati dal digiuno (Zhang, Ren et al. 2005). Il gruppo di Zhang dimostrò inoltre che obestatin esplica le proprie azioni biologiche legandosi selettivamente al GPR39, un recettore orfano appartenente alla famiglia di classe A dei recettori della rodopsina che comprende anche il recettore per ghrelin e per la motilina (Zhang, Ren et al. 2005). Tuttavia, studi successivi condotti in laboratori di ricerca differenti, non sono stati in grado di riprodurre, se non parzialmente, le attività anoressizzanti e inibitorie sulla motilità gastrointestinale, mettendone in discussione il ruolo originariamente attribuito ad obestatin. (Gourcerol and Tache 2007), (Zizzari, Longchamps et al. 2007). Sulla base dei risultati ancora contrastanti e in attesa di nuove delucidazioni sul ruolo di obestatin e del GPR39, è stato recentemente

proposto di rinominare obestatin “*ghrelin-associated-peptide*” (GAP), in linea con la nomenclatura vigente per altri peptidi biologicamente attivi, processati a partire dallo stesso gene (Gourcerol, St-Pierre et al. 2007).

### **Il recettore dei GHS**

Il recettore dei GHS appartiene alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle G-proteine e mostra la classica struttura a sette domini transmembrana con tre *loop* intracellulari e tre extracellulari (Figura 4).

Il gene per il GHS-R è unico, ma sono stati isolati due distinti cDNA codificanti per il GHS-R. Il GHS-R1a codifica nel ratto per un recettore di 366 aa, con peso molecolare di circa 41 kDa e presenta la classica struttura dei recettori accoppiati alle proteine G, mentre il GHS-R1b, prodotto mediante un meccanismo di *splicing* alternativo, codifica per una proteina più corta, di soli 289 aa, a 5 domini transmembrana: questa versione “tronca” del GHS-R1a non è in grado di legare i GHS nè di attivare meccanismi di trasduzione intracellulare.

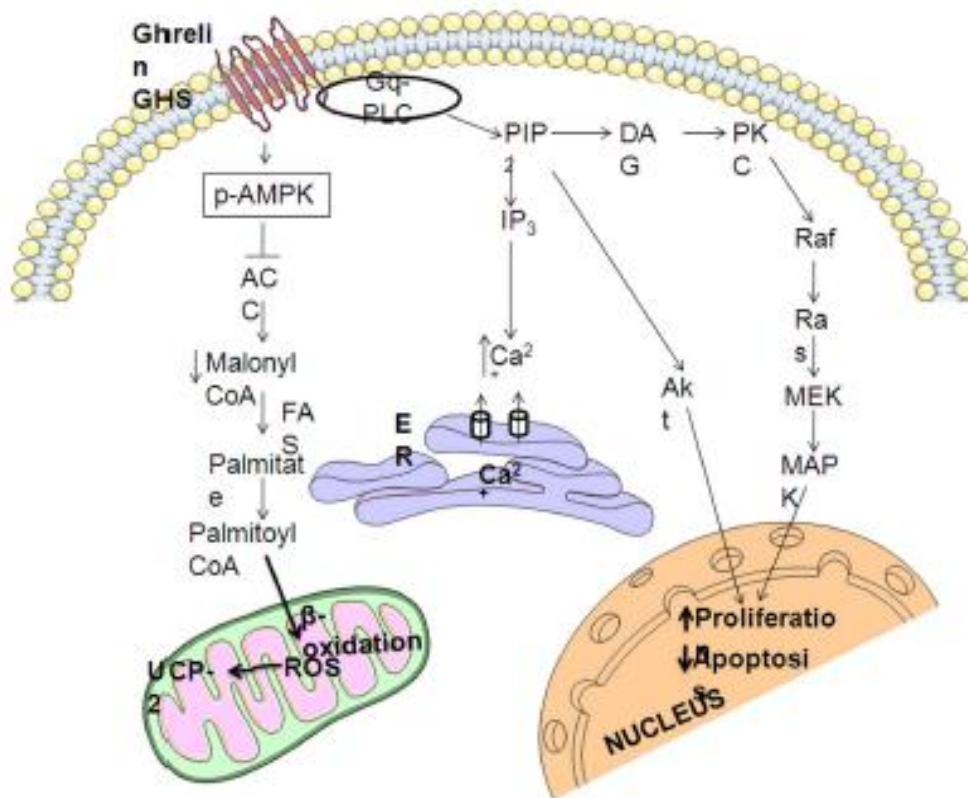


**Figura 4:** Modello del recettore a sette domini transmembrana GHS-R1a (Holst, Holliday et al. 2004).

Il GHS-R1a del ratto mostra un’elevata omologia di sequenza (>94%) con quello identificato nell’uomo e nel maiale. E’ in grado di legare numerose sostanze di origine sintetica, quali ad esempio GHRP-6, hexarelin e MK-0677 (Howard,

*Feighner et al. 1996*). E' stato dimostrato che l'mRNA per il GHS-R1a è espresso in numerose aree del SNC, quali l'ipotalamo, l'ipofisi, l'ippocampo e la sostanza nigra; tuttavia, l'espressione più marcata è stata identificata a livello ipotalamico ed in particolare nei nuclei preottico, anterolaterale, arcuato e paraventricolare (*Bennett, Thomas et al. 1997*)(*Burdyga, Varro et al. 2006*). In virtù della sua localizzazione in diverse aree del SNC, è stato ipotizzato che il GHS-R1a possa modulare i ritmi biologici, l'umore, la memoria, le capacità di apprendimento e l'appetito. Il GHS-R1a è espresso anche in numerosi tessuti periferici tra cui la tiroide, il polmone, il fegato, il tessuto adiposo, le cellule del sistema immunitario, il pancreas, il miocardio, la milza, il testicolo, l'ovaio, l'intestino e lo stomaco (*Gnanapavan, Kola et al. 2002*).

Il legame di ghrelin e dei GHS al GHS-R1a attiva una proteina Gαq in grado di iniziare la risposta intracellulare (Figura 5).



**Figura 5:** Meccanismi intracellulari mediati da ghrelin (*Frago et al 2011*).

L'attivazione della fosfolipasi C porta alla formazione di inositolo tri-fosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerolo (DAG); IP<sub>3</sub> induce il rilascio di calcio dai depositi intracellulari sensibili all'IP<sub>3</sub> stesso, mentre DAG attiva la proteina chinasi C. L'aumento del

calcio intracellulare inibisce i canali per il potassio voltaggio-indipendenti, consentendo l'ingresso di calcio dall'ambiente extracellulare attraverso i canali voltaggio-dipendenti di tipo L e di tipo T (Chen, Zhang et al. 1990; Adams)(Chen, Wu et al. 1996).

Nei topi knockout per il gene del GHS-R 1a, la somministrazione esogena di ghrelin non è in grado di aumentare né il rilascio di GH, né l'assunzione di cibo, dimostrando la funzionalità del recettore in entrambe le attività biologiche svolte da ghrelin (Sun, Wang et al. 2004).

### **ATTIVITA' ENDOCRINE DI GHRELIN**

Ghrelin stimola efficacemente il rilascio di GH sia *in vitro* che *in vivo*, in numerose specie animali, tra cui anche l'uomo. Tale effetto, più marcato rispetto a quello del GHRH, è dose dipendente ed è stato osservato sia dopo somministrazione endovenosa (e.v.), intraperitoneale (i.p.), sottocutanea (s.c.) e intracerebroventricolare (i.c.v.). Il picco di GH è osservabile 15-20 minuti dopo la somministrazione e i livelli di ormone permangono elevati per circa un'ora: pertanto ghrelin è in grado di generare una risposta efficace e duratura nel tempo (Nagaya, Kojima et al. 2006). Dati ottenuti da colture primarie di cellule ipofisarie dimostrano che ghrelin agisce direttamente sull'ipofisi, stimolando il rilascio di GH (Kojima, Hosoda et al. 1999); tuttavia è stato comunque suggerito un coinvolgimento dell'ipotalamo, poiché pazienti affetti da lesioni a livello ipotalamico mostrano un rilascio di GH scarso in seguito a stimolazione con ghrelin (Popovic, Miljic et al. 2003). In soggetti normali, la somministrazione contemporanea di ghrelin e di GHRH ha un effetto sinergico sulla secrezione di GH, maggiore di quello ottenuto con la dose massimale di GHRH, indicando la presenza di un differente meccanismo d'azione a livello ipofisario. Ciò suggerisce che altri fattori siano coinvolti *in vivo* per poter ottenere il livello massimo di rilascio di GH, mediante somministrazione esogena di ghrelin (Gualillo, Lago et al. 2006).

Sebbene gli studi incentrati sugli effetti di ghrelin nel sistema riproduttivo abbiano ricevuto attenzioni limitate, risultati più recenti indicano che ghrelin possiede attività a differenti livelli lungo l'asse riproduttivo (Fernandez-Fernandez, Martini et al. 2006). La somministrazione esogena di ghrelin sopprime il rilascio intermittente di LH nel ratto femmina normale o ovariectomizzato (Fernandez-

*Fernandez, Tena-Sempere et al. 2005*), e nel ratto maschio adulto (*Martini, Fernandez-Fernandez et al. 2006*). Inoltre ghrelin diminuisce il rilascio di GnRH da parte dell'ipotalamo e la secrezione di LH dipendente da GnRH (*Fernandez-Fernandez, Tena-Sempere et al. 2005*).

## **ATTIVITA' EXTRA-ENDOCRINE DI GHRELIN**

### **Regolazione del metabolismo energetico**

I livelli plasmatici di ghrelin sono elevati durante il digiuno e diminuiscono dopo l'assunzione di cibo, suggerendo che ghrelin agisca come segnale per l'inizio del pasto (*Cummings, Purnell et al. 2001*). La risposta post-prandiale di ghrelin dipende dalla composizione in macronutrienti del pasto: i carboidrati producono la riduzione più significativa nei livelli plasmatici di questo peptide, seguiti dalle proteine ed infine dai lipidi (*Cummings, Foster-Schubert et al. 2005*). I valori plasmatici sono inoltre negativamente correlati con il valore di BMI: sono elevati in soggetti con anoressia nervosa e cachessia e diminuiti nei soggetti obesi, ma la perdita di peso in seguito a dieta ipocalorica si associa ad un successivo incremento (*Purnell, Cummings et al. 2007*). La somministrazione endovenosa di ghrelin stimola il senso di appetito e l'assunzione di cibo in soggetti normopeso e obesi (*Wren, Seal et al. 2001*) (*Tassone, Broglio et al. 2003*), così come la sua somministrazione cronica induce un accumulo di tessuto adiposo nei roditori (*Tschop, Smiley et al. 2000*). Da questi dati possiamo concludere che ghrelin svolge un ruolo sia nella regolazione a breve termine (assunzione di cibo) che a lungo termine del metabolismo energetico. Il ruolo di ghrelin nell'omeostasi energetica non sembrava significativo, in quanto topi *knock-out* per ghrelin mostrano un normale fenotipo e un normale comportamento alimentare e riproduttivo; se però questi animali vengono precocemente sottoposti ad una dieta ad elevato contenuto in lipidi non aumentano di peso, bensì hanno un minor accumulo di tessuto adiposo ed una maggiore spesa energetica ed attività locomotoria, suggerendo che ghrelin abbia un ruolo nell'accumulo di lipidi introdotti con la dieta (*Wortley, del Rincon et al. 2005*).

L'azione di ghrelin sull'assunzione di cibo è mediata dall'interazione con i suoi recettori presenti sia nell'ARC dell'ipotalamo sia sui neuroni afferenti del nervo vago. La somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.) di ghrelin induce



nell'ARC un incremento nell'espressione genica di NPY e AgRP e una riduzione dell'espressione di POMC e CART. L'ablazione dei neuroni NPY/AgRP nel topo sopprime completamente la risposta in termini di assunzione di cibo indotta da ghrelin; tale risposta risulta solo attenuata in topi NPY- o AgRP-null (*Chen, Trumbauer et al. 2004*) (*Luquet, Phillips et al. 2007*). La somministrazione icv di ghrelin attiva non solo i neuroni dell'ARC, ma anche quelli del PVN e della LHA, in particolare si osserva l'espressione di Fos, un marker dell'attivazione neuronale, nei neuroni che liberano le orexine, ma non in quelli che producono MCH. Inoltre in topi *knock-out* per le orexine, la stimolazione dell'assunzione di cibo in seguito a trattamento con ghrelin è abolita (*Toshinai, Date et al. 2003*). L'azione di ghrelin sull'assunzione di cibo potrebbe essere mediata da AMPK; infatti la somministrazione di una dose di ghrelin in grado di stimolare l'assunzione di cibo nel ratto aumenta l'attività di AMPK nell'ipotalamo (*Andersson, Filipsson et al. 2004*).

La somministrazione di ghrelin riduce il rilascio di leptina e reciprocamente la somministrazione di leptina riduce i livelli plasmatici di ghrelin; in particolare è stato recentemente dimostrato che la leptina inibisce sia la secrezione di ghrelin da parte dello stomaco sia la stimolazione dell'assunzione di cibo indotta da ghrelin (*Kalra, Ueno et al. 2005*). Questa interazione reciproca tra leptina e ghrelin è stata denominata "ghrelin-leptin tango" (*Konturek, Konturek et al. 2005*). Leptina e ghrelin sono molecole complementari che agiscono sullo stesso sistema di regolazione per informare le strutture centrali dello stato energetico dell'organismo in acuto e in cronico; questi due peptidi conferiscono ritmicità al sistema NPYergico, la via finale comune sulla quale esercitano la loro azione. Kalra et al. hanno suggerito che questo duplice controllo su ghrelin da parte di leptina sia uno dei principali meccanismi di comunicazione a feed-back tra la periferia e l'ipotalamo per la regolazione dell'omeostasi energetica e che la compromissione di questo sistema di comunicazione comporti la perdita del controllo ipotalamico sull'assunzione di cibo che si traduce in un aumento del peso corporeo fino all'obesità (*Kalra, Ueno et al. 2005*).

Anche alcuni GHS, somministrati per via centrale o periferica, possiedono una spiccata attività oressizzante, non necessariamente accompagnata da quella di stimolo della secrezione di GH; questo suggerisce che le due azioni possono essere distinte e mediate dall'interazione con recettori differenti (*Torsello, Luoni et al.*

1998). L'effetto osservato è inoltre indipendente dal GHRH, ma richiede l'integrità dei nuclei ipotalamici e la partecipazione di NPY (Torsello, Locatelli et al. 2000).

## **IL FEEDBACK NEGATIVO PERIFERICO: I SEGNALI DI SAZIETÀ'**

### **INSULINA**

L'insulina è il principale ormone regolatore della glicemia e gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'appetito (Pliquett R et al. 2006). Il cervello umano tradizionalmente è sempre stato considerato come un organo insulino-insensibile. Tuttavia, studi sull'animale e sull'uomo hanno dimostrato che nel cervello sono espressi recettori per l'insulina, in particolare a livello di ipotalamo, ippocampo e della corteccia cerebrale (Havrankova J et al. 1978). Recenti lavori sull'animale hanno dimostrato che l'insulina inibisce l'appetito a livello del SNC (Woods et al. 1979). In studi successivi è stato inoltre evidenziato che l'insulina attraversa la barriera emato-encefalica (Schwartz M et al. 1991). Se somministrata direttamente a livello centrale, gli effetti dell'insulina sul SNC includono la soppressione dell'introduzione di cibo (Schwartz M et al. 2000) e l'inibizione della gluconeogenesi a livello epatico tramite un segnale a livello ipotalamico (Obici S et al. 2002). Infine la delezione selettiva dei recettori per l'insulina a livello cerebrale induce iperfagia, obesità e insulino resistenza nei topi (Bruning J et al. 2000).

### **LEPTINA, ADIPONECTINA E RESISTINA**

La leptina è un peptide espresso e secreto dal tessuto adiposo bianco in modo proporzionale alla massa di grasso corporeo (Wilding JP, 2002). Sia leptina sia il suo recettore sono anche stati isolati nell'uomo a livello della mucosa gastrica indicando una possibile regolazione paracrina degli altri peptidi gastrici (Wynne K et al. 2005)(Hellostrom PM et al. 2004).

La leptina svolge un ruolo centrale nella regolazione dell'assunzione di cibo e della spesa energetica. La leptina aumenta alcune ore prima dei pasti nei roditori e dopo diversi giorni di iperalimentazione negli uomini (Kolaczynsky JW et al. 1996), mentre si riduce in corso di digiuno (Neary NM et al. 2004).

La leptina svolge la sua attività principale a livello centrale, in particolare nell'ARC e nel PVN (Wilding JP, 2002), attraverso l'attivazione di specifici recettori chiamati

OB-Rb. Nello specifico la leptina inibisce i neuroni NPY e AgRP, portando a una riduzione dell'assunzione di cibo (*Hellstrom PM et al. 2004*).

I topi knock-out per la leptina (ob/ob) o per il recettore della leptina (db/db) sono obesi, iperfagici e iperinsulinemici (*Chua SC et al. 1996*). Come nei topi, anche nell'uomo mutazioni geniche che portano a un difetto della leptina sono state descritte come rara causa di obesità che si normalizza completamente durante terapia sostitutiva (*Neary NM et al. 2004*). Tuttavia, non tutti i fenotipi obesi derivano dal deficit di leptina. Infatti, nell'uomo l'obesità è fortemente associata ad alti livelli plasmatici di leptina, suggerendo invece una condizione di leptino-resistenza.

La secrezione di leptina è regolata da diversi segnali metabolici e ormonali. In particolare, il rilascio gastrico di leptina è anche stimolato in modo consistente dall'attivazione delle afferenze vagali, suggerendo così che questo ormone sia coinvolto non solo nel mantenimento a lungo termine del bilancio del peso ma anche nella fase cefalica della digestione (*Sobhani I et al. 2002*).

L'adiponectina è un peptide prodotto esclusivamente dagli adipociti; esso dimostra un'omologia strutturale con la famiglia dei peptidi TNF, citochine caratterizzate dall'aver un effetto negativo sul bilancio energetico (*Wilding JP, 2002*).

Diversamente dalla leptina, i livelli di adiponectina non seguono ritmi circadiani e sembrano non essere influenzati dall'alimentazione (*Hotta K et al. 2000*). Tuttavia, l'adiponectina è correlata negativamente con l'indice di massa corporea e si riduce nei topi ob/ob. L'evidenza di livelli di adiponectina più bassi nei soggetti obesi diabetici che nei soggetti obesi non diabetici, suggerisce un ruolo importante di adiponectina nello sviluppo dell'insulino-resistenza.

La resistina è secreta dal tessuto adiposo ed esercita la propria attività su diversi tessuti periferici, come il fegato e il muscolo (*Hellstrom PM et al. 2004*). Sembra possedere effetti inversi rispetto all'adiponectina; infatti, livelli più alti possono aumentare l'insulino-resistenza.

### **GLUCAGON-LIKE-PEPTIDE 1**

Il GLP-1 è un peptide di 30 aa derivato dallo stesso precursore del glucagone ed è espresso e secreto dalle cellule endocrine-L della mucosa intestinale a livello dell'ileo e del colon (*Naslund E et al. 1999*).

Il GLP-1 mostra diverse attività, tra cui la capacità di aumentare la secrezione di insulina e di sopprimere quella di glucagone nella fase postprandiale (*Orskov C, 1992*).

Negli animali e nell'uomo il GLP-1 rallenta lo svuotamento gastrico e quindi attenua la risposta insulinica indotta dal cibo (*Naslund E et al. 1999*).

Oltre a tali effetti endocrino-metabolici, studi recenti hanno mostrato che il GLP-1 sarebbe in grado di inibire anche l'appetito e di ridurre l'assunzione di cibo. Infatti, nel ratto, la somministrazione centrale di GLP-1 inibisce l'assunzione di cibo e acqua con un effetto specifico (poiché è inibito da antagonisti di GLP-1), ma anche antagonizzando l'effetto oressizzante di NPY (*Turton MD et al. 1996*). Questo effetto è dose-dipendente e prolungato nel tempo, e ciò rende GLP-1 un interessante strumento terapeutico per l'obesità.

### **COLECISTOCHININA**

La colecistochinina (CCK) è stato il primo ormone intestinale descritto come inibitore dell'assunzione di cibo nei roditori (*Gibbs J et al. 1973*). E' ampiamente espressa sia a livello centrale che a livello periferico, in particolare nelle cellule - I a livello della mucosa del duodeno e del digiuno. Sono stati isolati due sottotipi del recettore per la CCK: il recettore CCKA, espresso nel nervo vago, nei neuroni enterici, nel pancreas e a livello centrale e il recettore CCKB, espresso nelle afferenze vagali, nel SNC e nello stomaco.

Si è dimostrato che il rilascio di CCK è un segnale di sazietà, in particolare nella regolazione a breve termine dell'alimentazione (*Moran TH, 2000*).

Questo peptide agisce in sinergia con leptina, sui PVN e NTS ipotalamici ed è in grado di stimolare la secrezione di amilina il cui effetto è ridotto dalla vagatomia e dalla distruzione delle afferenze vagali (*Konturek SJ et al. 2004*).

La somministrazione periferica di CCK è seguita da un effetto rapido ma di breve durata sull'inibizione dell'assunzione di cibo, con un picco di attività a 30 minuti.

### **PEPTIDE YY<sub>3-36</sub>**

Il peptide YY<sub>3-36</sub> (PYY) è un peptide di 36 aminoacidi, membro della famiglia NPY e secreto dalle cellule-L del piccolo e grande intestino, incluso il retto e rilasciato nella circolazione come PYY<sub>1-36</sub> o PYY<sub>3-36</sub>.

PYY è stato definito un peptide oressizzante, mentre PYY<sub>3-36</sub>, la forma più abbondante nel circolo sanguigno, mostra effetti anoressizzanti.

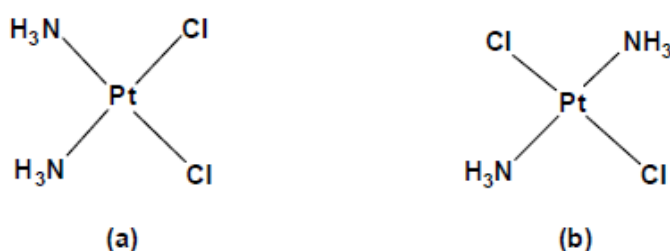
PYY<sub>3-36</sub> esercita il suo effetto modulatorio sull'assunzione di cibo agendo sui recettori Y2 a livello ipotalamico, e, di conseguenza, sopprimendo l'effetto oressizzante di NPY (*Hellstrom PM et al. 2004*).

Consensualmente, PYY<sub>3-36</sub> non riduce l'introito calorico nei topi Knockout per Y2. I livelli plasmatici di PYY<sub>3-36</sub> aumentano dopo l'ingestione di cibo (*Batterham RL et al 2002*).

## CISPLATINO

Il *cis*-diamminodichloroplatino(II) ( $cis\text{-(NH}_3\text{)}_2\text{PtCl}_2$ , *cis*-DDP, cisplatino) fu scoperto nel 1844, quando venne sintetizzato da Michel Peyrone, e divenne noto con il nome di “Cloruro di Peyrone”(Peyrone M.M, 1844).

Cinquant’anni dopo Alfred Werner, nella sua teoria della chimica di coordinazione, assegnò correttamente a questo composto la geometria *cis*, distinguendolo dal suo isomero *trans* (Werner A, 1905), anche se la sua struttura venne determinata ai raggi X solo nel 1966 (Millburn G.H.W, 1966) (Figura 6).



**Figura 6:** Isomeri del diamminodichloroplatino (II): *cis*-DDP (cisplatino)(a) e *trans*-DDP (b).

Nel 1965, nel corso di alcuni saggi in vitro realizzati per valutare gli effetti di un campo elettromagnetico sulla crescita di *Escherichia coli*, Rosenberg et al. notarono che la forma dei batteri da cilindrica era diventata filamentosa: essi erano cioè aumentati di volume e cominciarono ad allungarsi formando lunghi filamenti, senza tuttavia dividersi (Rosenberg B et al, 1965).

Fino a due ore dopo la rimozione del campo stesso le cellule continuavano ad allungarsi, ma, oltre le due ore, la divisione cellulare riprendeva di nuovo. Durante la formazione di questi filamenti, i batteri di *Escherichia coli* potevano ancora crescere, ma, poiché non riuscivano a dividersi, subivano una crescita filamentosa fino a raggiungere una lunghezza circa 300 volte superiore a quella normale.

L’interpretazione del fenomeno fu che la sintesi di DNA, ma non quella dell’RNA e delle proteine, era risultata inibita sotto quelle particolari condizioni sperimentali. L’agente responsabile di tale inibizione fu dagli stessi autori identificato in un composto originatosi dalla reazione tra il platino Pt (scelto per la sua inerzia chimica in ambiente biologico) rilasciato dall’elettrodo e il cloruro di ammonio presente nel mezzo di coltura: il *cis*-diamminodichloroplatino.

Dopo aver dimostrato che il cisplatino inibiva la divisione cellulare dei batteri, Rosenberg e i suoi collaboratori pensarono che questo composto avrebbe potuto bloccare la divisione delle cellule tumorali senza risultare estremamente tossico per l'organismo ospite. Inizialmente il complesso venne sperimentato su due linee cellulari tumorali del topo e il sarcoma 180. Per prima cosa determinarono i livelli di sostanza da iniettare, trovando che la dose necessaria per uccidere metà delle cavie era di circa 13 mg di farmaco per chilogrammo di peso corporeo dell'animale ( $LD_{50} = 13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); la dose non letale corrispondeva a  $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , e si stabilì che i composti del platino potevano essere usati nel trattamento dei tumori murini senza portare alla morte dell'animale (Rosenberg B et al. 1999). A questo punto venne impiantato sottocute nella zona ascellare del topo un tumore solido del sarcoma 180 e venne lasciato crescere per 8 giorni fino a raggiungere la massa di 1 g, dimensione notevole considerando che i topi pesavano circa 20 g l'uno. L'ottavo giorno fu iniettato il *cis*-diamminodichloroplatino(II) e questo trattamento fece regredire totalmente il tumore in sei giorni. Il topo non trattato morì dopo 21 giorni, quando il tumore pesava 3 g.

Questi risultati furono particolarmente sorprendenti perché a quel tempo non si conoscevano altri farmaci antitumorali aventi gli stessi effetti. Inoltre, il sistema immunitario dei topi trattati rigettava i reimpianti dello stesso tumore fino a undici mesi dopo il trattamento; i topi trattati vissero oltre la loro aspettativa di vita (circa trenta mesi) morendo di cause naturali. Dopo aver ottenuto questi entusiasmanti risultati, si passò a studi su diversi animali per determinare gli effetti tossici di diverse dosi di cisplatino, con risultati che lo portarono ad essere considerato un effettivo agente antineoplastico per la cura dei tumori umani. Sulla base di tali dati il farmaco fu quindi introdotto in studi di fase I di sperimentazione umana presso il *National Cancer Institute* (Kelland, 2007).

Nella prima fase degli studi clinici, il cisplatino venne testato su malati terminali di cancro, che non rispondevano più alle terapie in uso. Nonostante la prognosi infausta per i malati in questo stadio, alcuni pazienti ebbero dei benefici dal trattamento: quasi il 20% si riprese parzialmente o completamente. In particolare, il cisplatino produsse buoni risultati nell'80% dei malati di cancro ai testicoli, in più del 90% dei pazienti con carcinoma ovarico, nel 40% di quelli con tumori del collo e della testa e in circa il 40% dei pazienti con linfomi. Al contrario, il

carcinoma del colon, un tipo di cancro molto resistente ai farmaci, non rispose affatto al trattamento con cisplatino (*Kelland 2007*).

Nella seconda fase di test clinici il cisplatino fu usato in combinazione con altri farmaci nel trattamento di tumori con diagnosi precoce con la speranza che i farmaci producessero un effetto sinergico o almeno additivo nella cura del tumore, senza aumentare gli eventuali effetti collaterali. Il cisplatino venne testato in combinazione con uno, due, tre o anche quattro farmaci con buoni risultati. Un importante esempio fu la combinazione del cisplatino con il 5- fluorouracile nel trattamento di malati terminali di carcinoma al colon. Uno studio dimostrò che tre pazienti su nove ebbero una diminuzione del tumore superiore al 50% e questo fu un risultato incoraggiante, in quanto il cisplatino da solo non aveva mostrato alcun effetto verso tale forma di tumore durante la fase I di sperimentazione(*Kotz et al. 1999*).

Visti questi risultati, il cisplatino fu approvato dalla *Food and Drug Administration* alla fine del 1978 per il trattamento di tumori all'apparato genitourinario. Ancora oggi è uno dei farmaci più usati per il trattamento di varie forme di cancro (*Pil P, 1997*).

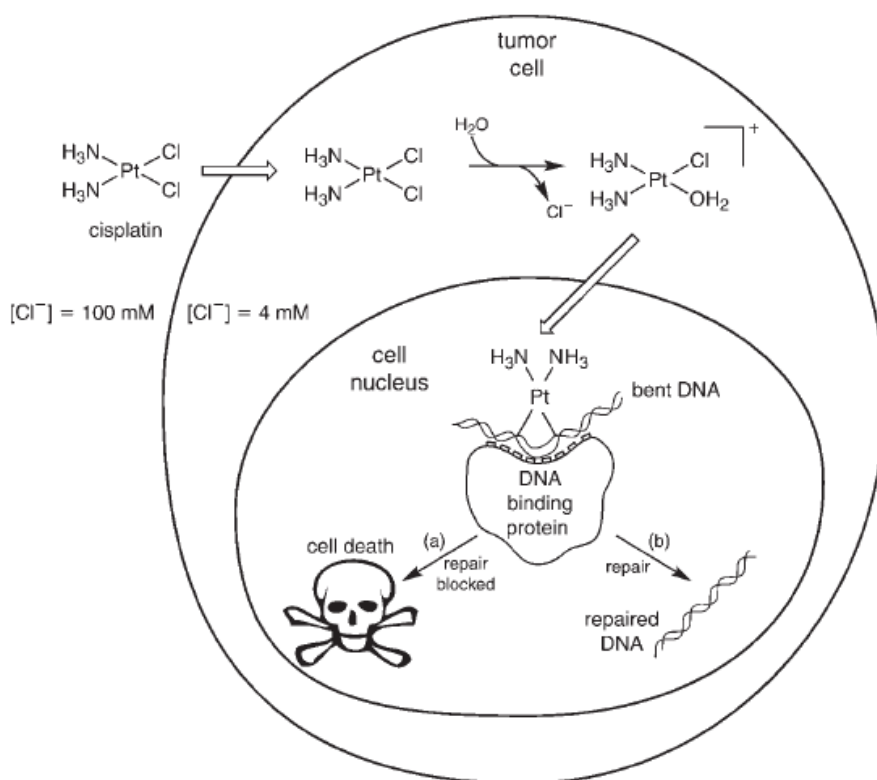
### ***Meccanismo d'azione***

Dal punto di vista chimico, la molecola del cisplatino ha configurazione planare quadrata, con l'atomo di Pt in posizione centrale circondato da due molecole di NH<sub>3</sub> e da due atomi di Cl in posizione cis. La posizione cis dei ligandi di partenza è essenziale per l'attività antitumorale di tali composti, dato che gli isomeri trans di molti complessi di Pt esaminati hanno mostrato un'attività minore in confronto ai loro congeneri cis. Si ritiene generalmente che nella cellula, ad un pH di circa 7,4 e alla temperatura di 37°C, il complesso di Pt neutro venga rapidamente solvatato alle forme monocloromonoidrata o diidrato per sostituzione sequenziale dei due atomi di Cl con due molecole di H<sub>2</sub>O. Sufficienti evidenze sperimentali indicano che il farmaco nella sua forma originaria è biologicamente inattivo e che le sole specie efficacemente citotossiche sono quelle mono e diidrato (*Rosenberg 1985*).

La presenza di concentrazioni di Cl<sup>-</sup> maggiori di 5 mEq l<sup>-1</sup> inibisce la reazione di idrolisi. Così quando il farmaco è somministrato per via endovenosa, data l'elevata concentrazione di Cl<sup>-</sup> nel plasma (circa 100 mEq l<sup>-1</sup>) e nei restanti liquidi



extracellulari, il 98% circa della dose di farmaco circolante rimane nella forma indissociata e inattiva e come tale può penetrare per diffusione passiva all'interno delle cellule. Una volta pervenuto nel liquido intracellulare, la cui concentrazione di  $\text{Cl}^-$  è assai minore (circa 4 mEq l<sup>-1</sup>), il composto viene idrolizzato con formazione delle specie attive. Queste ultime possono reagire con i componenti intracellulari: il processo tramite il quale il CDDP dà luogo a fenomeni di citotossicità è direttamente legato alle sue proprietà biologiche di interagire con il materiale genetico cellulare, inducendo così un danno al DNA cromosomiale (Roberts 1986) (Figura 7). Si pensa comunque che l'evento critico ai fini dell'effetto citotossico sia rappresentato dal legame di tali specie con i residui nucleofili del DNA (con l'atomo N in posizione 7 per la guanina e con quello in posizione 3 per la citosina), con formazione di ponti intra e intermolecolari, secondo una reazione che presenta molte analogie con quella degli agenti alchilanti bifunzionali (Pinto et al. 1985).



**Figura 7:** Meccanismo d'azione del cisplatino (Alderden et al, 2006).

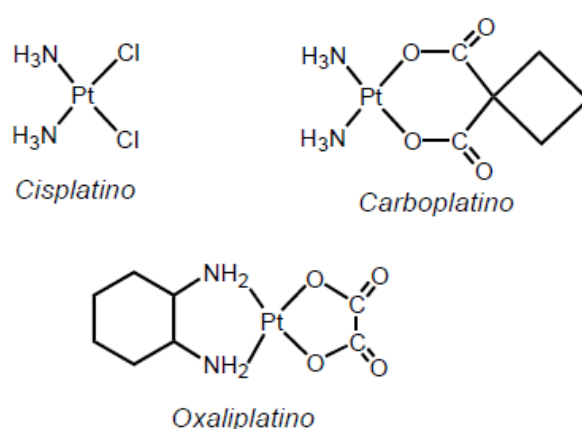
Sono possibili quattro differenti tipi di addotti con il DNA e si ritiene che i legami monofunzionali e quelli incrociati tra DNA e proteine causino effetti minimi o non

letali, mentre responsabili degli effetti citotossici riscontrati sono i due addotti con il DNA (quello reticolato intracatena e quello intercatena), anche se resta ancora controverso quale dei due sia più direttamente responsabile della letalità cellulare. Il principale tipo di reticolazione sulla stessa catena del DNA è quello tra basi adiacenti di guanina ed è stato suggerito da Rosenberg che questo legame bidentato svolga una funzione essenziale nella eliminazione selettiva delle cellule tumorali da parte del CDDP. Resta da aggiungere che nel plasma il cisplatino si lega progressivamente alle plasmaproteine (albumina e globuline) con una costante di reazione simile a quella calcolata teoricamente per l'idrolisi dei due atomi di Cl- (*Litterst 1984*). E' stato dimostrato che approssimativamente il 90% di Pt, iniettato come cisplatino, si lega alle proteine entro due ore dalla somministrazione. Si ritiene di conseguenza che nel plasma il farmaco vada incontro ad una sostituzione degli atomi di Cl da parte di gruppi altamente nucleofili, rappresentati essenzialmente da gruppi solfidrici delle plasmaproteine stesse. Tale fenomeno riveste notevole importanza farmacologica in quanto, essendo l'equilibrio della reazione di sostituzione spostato a favore della quota SH-sostituita, il legame del farmaco con le plasmaproteine è praticamente irreversibile e la frazione legata definitivamente inattivata. E' stato infatti dimostrato, in studi su colture cellulari, che soltanto la frazione di Pt libero ha attività citotossica (*Holdener et al. 1978*).

L'impiego di metodologie quali la cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC), la spettrometria di emissione atomica a plasma induttivo (ICP-AES), nonché l'associazione delle due ha consentito di evidenziare come, dopo somministrazione endovenosa rapida, il decadimento plasmatico della quota libera sia veloce e caratterizzato da una curva ad andamento bifasico con un'emivita iniziale di 9,7 min e terminale di 40,4 min e come l'eliminazione del farmaco sia quasi esclusivamente urinaria, con il 48% circa della dose somministrata escreta nelle 24 ore successive alla somministrazione, la rimanente frazione permanendo a lungo nell'organismo in associazione alla plasma proteine o depositata in particolare nei parenchimi; reni, fegato, polmoni e ovaie (*Patton et al. 1978*).

### Derivati del cisplatino

Dalla scoperta di Rosenberg dell'attività antitumorale del cisplatino alla fine degli anni 60, più di 3000 complessi di platino sono stati sintetizzati e saggiati con lo scopo di rendere più ampio lo spettro di attività antitumorale del composto e/o ridurre gli effetti collaterali. Al momento, tuttavia, solo due ulteriori complessi di platino sono entrati nella terapia clinica mondiale: il *cis*-[diammino-1,1-ciclobutanodicarbossilato platino(II)] (carboplatino) ed il *cis*-[1,2-diamminocicloesano-ossalato platino(II)] (oxaliplatino). (Figura 8)



**Figura 8:** Strutture schematiche di cisplatino, carbonplatino e oxaliplatino.

Nonostante il successo di questi farmaci (praticamente tutti i regimi clinici di trattamento chemioterapico combinato contengono il cisplatino o un composto analogo), vi è ancora un ampio margine per lo sviluppo di nuove sostanze, purchè esse presentino caratteristiche innovative rispetto all'esistente.

In particolare, composti innovativi devono possedere attività verso linee o forme tumorali resistenti ai composti di platino convenzionali (e possibilmente anche ai chemioterapici di natura organica) e devono presentare una tossicità sistemica limitata.

Anche dal punto di vista della comprensione dei meccanismi d'azione la ricerca è ben lontana dall'essere esaurita. Basti pensare che, seppure il cisplatino sia utilizzato in fase clinica da circa 30 anni e sia stato ampiamente studiato in tutto il mondo, numerosi aspetti del suo meccanismo di azione sono ancora incompresi. Soltanto i primi stadi dell'azione del cisplatino sono conosciuti con relativa certezza; essi comprendono il trasporto all'interno della cellula, l'attivazione in

seguito ad idrolisi dei cloruri, la coordinazione al DNA con prevalente formazione di cross-link tra due siti N7 di nucleobasi puriniche adiacenti (*intrastrand G,G e A,G cross-link*). Tali addotti, stabili ed inerti, provocano delle distorsioni nella doppia elica del DNA le quali, apparentemente, inducono la morte cellulare per apoptosi tramite una complessa e non ben chiara successione di reazioni che coinvolgono numerosi fattori (proteine HMG, enzimi di riparo e, in particolare, il gene p53, ed altri).

Nuovi farmaci antitumorali più selettivi verso il tessuto tumorale potrebbero essere ottenuti modificando opportunamente il cisplatino o i suoi analoghi onde sfruttare alcune caratteristiche peculiari del tessuto tumorale come bersaglio selettivo.

### ***Tossicità***

Il cisplatino, a dosaggi elevati o dopo cicli multipli di trattamento, causa una neuropatia progressiva dei nervi motori periferici e sensoriali che può peggiorare dopo la sospensione del farmaco. E' nefrotossico e ototossico; inoltre, in quasi i tutti i pazienti trattati con cisplatino si sviluppano forte nausea e vomito. Il cisplatino causa mielosoppressione lieve o moderata caratterizzata da leucopenia e trombocitopenia transitorie a livello renale; dopo cicli multipli di trattamento, l'anemia può diventare preminente. Sono comuni alterazioni dei livelli degli elettroliti, tra cui ipomagnesiemia, ipocalcemia, ipokaliemia e ipofosfatemia. Entro pochi minuti dalla somministrazione, possono instaurarsi reazioni di tipo anafilattico, caratterizzate da edema facciale, broncocostrizione, tachicardia e ipotensione. Nel periodo di trattamento si evidenzia una perdita dell'appetito con conseguente deperimento fisico. Il cisplatino a dosaggi elevati o dopo cicli multipli di trattamento causa una neuropatia progressiva dei nervi motori periferici e sensoriali che può peggiorare dopo la sospensione del farmaco (*Kelland 2007*).

## **CACHESSIA**

La cachessia, dal greco “kakos” cattivo ed “hexis” condizione, è caratterizzata da perdita di peso, anoressia, astenia, perdita di massa muscolare, deplezione dei depositi adiposi associata ad un aumento del dispendio energetico ed è frequentemente associata a una varietà di patologie, tra cui cancro, AIDS, infarto, danno renale, artrite reumatoide e fibrosi cistica. Per queste caratteristiche la cachessia si correla a una scarsa qualità di vita, a una minore risposta alle terapie farmacologiche e a una ridotta probabilità di sopravvivenza (*Ryden and Arner 2007*).

La cachessia è stata spesso classificata come una delle sindromi di difficile definizione che viene riconosciuta all'osservazione (“I can't define what it is, but I know when I see it”) (*Ryden and Arner 2007*).

La cachessia neoplastica (“*cancer cachexia*” o “*wasting disease*”), è caratterizzata da perdita di massa muscolare con o senza perdita di massa grassa. L'aspetto clinico preminente della cachessia nell'adulto è la perdita di peso.

L'anoressia, l'infiammazione cronica, la resistenza all'insulina e l'aumentato catabolismo delle proteine del tessuto muscolare sono condizioni frequentemente associate, e ritenute parimenti responsabili del quadro fenotipico della cachessia. La cachessia è da considerarsi diversa dalla inanizione, dalla perdita di tessuto muscolare correlata all'età (sarcopenia), dai deficit nutrizionali associati alla depressione primaria e alla sindrome da malassorbimento, e dall'ipertiroidismo: essa si accompagna ad una aumentata morbilità e mortalità (*Evans et al. 2008*).

Nel termine di cachessia neoplastica vengono compresi sia i veri casi di cachessia che i casi di scadimento dello stato nutrizionale secondario a ostruzione del tratto digerente, a tossicità da trattamento chemio-radioterapico, a malassorbimento intestinale da sindromi post chirurgiche (cachessia secondaria). Tale differenza tra cachessia “primaria” (come finora definita) e secondaria presuppone un atteggiamento terapeutico differenziato, sottolineando nel secondo caso (cachessia secondaria) una maggiore efficacia degli interventi nutrizionali artificiali e non (*Fearon K et al. 2011*).

La cachessia rappresenta, indipendentemente dall'istologia e dalla localizzazione del tumore primitivo, la più frequente sindrome paraneoplastica nei pazienti affetti da cancro in fase avanzata. Oltre il 70% dei pazienti affetti da neoplasia,

soprattutto nelle fasi avanzate, sviluppa i segni e i sintomi della cachessia e circa il 20% muore per le conseguenze della malnutrizione.

I meccanismi fisiopatologici implicati nello sviluppo della cachessia non sono noti. Nella cachessia si riscontrano alterazioni di tutti i sistemi metabolici, produzione di fattori circolanti in parte prodotti dal tumore, in parte dalle cellule dell'ospite, principalmente i macrofagi, in risposta al tumore, e ridotto introito calorico. Talune di queste alterazioni compaiono precocemente durante la storia naturale della malattia neoplastica (*Fearon K et al. 2011*).

### ***Calo ponderale***

La variabilità del peso, anche quando normalizzato per l'altezza ed espresso come indice di corporea (BMI), è molto ampia nei pazienti neoplastici. Esiste una correlazione fra l'entità della perdita di peso e la sopravvivenza. Non sempre però l'anoressia è associata alla perdita di peso e la loro patogenesi può essere differente. Inoltre la perdita di peso non può essere spiegata dalla sola diminuzione dell'apporto di cibo.

Esiste una significativa correlazione tra aumento del consumo energetico e calo ponderale: infatti l'entità dell'aumento del metabolismo basale (consumo energetico a riposo) del paziente neoplastico, valutata tra il 14 ed il 41% rispetto al soggetto normale, equivale ad una perdita mensile di 1-2 kg di massa muscolare e di 0,5-1 kg di grasso corporeo (*Fearon K et al. 2011*).

L'incidenza di perdita di peso al momento della diagnosi varia grandemente in accordo con la sede del tumore. Nei pazienti affetti da forme poco aggressive di linfoma di Hodgkin, leucemia acuta non linfocitica e tumore della mammella, la frequenza di perdita di peso è del 30-40%. Le forme più aggressive di linfoma non-Hodgkin, carcinoma del colon, e altre neoplasie, in particolare neoplasie dell'esofago e del tratto testa-collo, sono associate ad una incidenza di perdita di peso del 50-60%. I pazienti con tumore del pancreas o dello stomaco hanno la più alta incidenza alla diagnosi di perdita di peso (più dell'80%) (*Kubrak C et al. 2010*).

### ***Alterazioni biochimico-metaboliche***

*Metabolismo glucidico:* aumentata gluconeogenesi a partire da lattato, aminoacidi muscolari e acidi grassi liberi con perdita delle riserve proteiche e lipidiche.

*Metabolismo proteico:* aumentato turnover associato a riduzione della sintesi proteica muscolare ed epatica, aumento della sintesi epatica di proteine della fase acuta, aumento dei livelli sierici di fattore inducente la proteolisi (PIF), aumentata degradazione proteica a livello del tessuto muscolare. L'iperattivazione di sistemi proteolitici muscolari, quali ad esempio quello della *ubiquitina-proteasoma*, è presente anche prima che si sia verificato calo ponderale, suggerendo che le alterazioni biomolecolari responsabili della perdita di massa magra si evidenziano precocemente durante la storia naturale della malattia neoplastica. Altri meccanismi proteolitici prevedono l'attivazione di sistemi calcio-dipendenti, quali quello delle *calpaine* (regolate da una chinasi ATP-dipendente e da un inibitore, la calpastatina) (Lelli G et al. 2003).

*Metabolismo lipidico:* aumento della beta-ossidazione degli acidi grassi e del turnover degli acidi grassi liberi, aumento della lipoproteinlipasi sierica, ipertrigliceridemia, produzione del fattore mobilizzante i lipidi (LMF) che induce lipolisi.

Il quadro metabolico complessivo è quindi caratterizzato da:

- aumentato fabbisogno glucidico, proteico e vitaminico;
- impossibilità di introdurre con gli alimenti i substrati energetici in conseguenza dell'anoressia, della nausea e del vomito;
- ricorso alla gluconeogenesi con depauperamento delle riserve proteiche e lipidiche e conseguente perdita di peso;
- difficile utilizzazione del glucosio neformato per ipoinsulinemia e/o resistenza periferica all'insulina;
- danno ossidativo indotto dai radicali liberi dell'O<sub>2</sub> sul DNA, sulle lipoproteine di membrana e su enzimi e coenzimi centrali nel regolare le principali vie metaboliche cellulari (Lelli G et al. 2003).

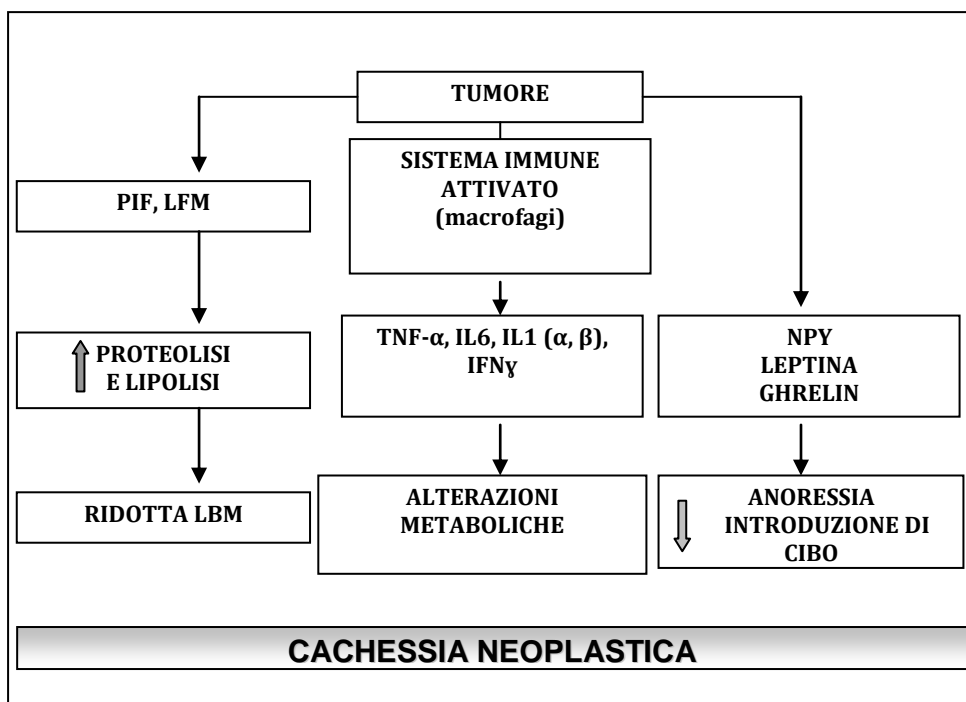
### ***Ruolo delle citochine***

Alcuni "effetti sistemici" della cachessia neoplastica quali anoressia, "fatigue" e aumentato dispendio energetico a riposo sono il risultato dell'azione di fattori del tumore (PIF), in parte dalle cellule dell'ospite, principalmente i macrofagi, in risposta al tumore.

Tra essi un ruolo centrale è dato dalle citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) le quali attivano la risposta di fase acuta con ridotta sintesi di proteine nobili (albumina, prealbumina e transferrina), aumentata sintesi di CRP, aptoglobina e ceruloplasmina, aumento del turnover degli acidi grassi e della proteolisi muscolare. Al contrario, citochine antinfiammatorie come IL-4 e IL-10 sembrerebbero possedere proprietà anticachettiche (Lelli G et al. 2003).

Una componente chiave del circuito omeostatico di regolazione del peso corporeo è la leptina, un ormone secreto dal tessuto adiposo. La leptina svolge un ruolo importante nello stimolare la risposta adattativa al digiuno prolungato dal momento che la perdita di peso causa una riduzione dei livelli di leptina proporzionali alla perdita di grasso corporeo. Bassi livelli di leptina a livello ipotalamico potenziano l'attività dei segnali oressigeni che stimolano l'appetito e riducono il dispendio energetico a riposo, e inibiscono l'attività dei segnali anoressigeni.

La patogenesi dell'anoressia neoplastica prevede inoltre alterazioni qualitative e quantitative dei segnali ipotalamici, tra cui l'inibizione dell'effetto oressigeno del neuropeptide Y indotto dalle citochine proinfiammatorie, aumento del corticotropin-releasing factor (CRF) e della melanocortina, dei segnali gastrici (alterazioni della secrezione di ghrelin e della colecistochinina) in seguito all'azione di mediatori sistemici e locali (Lelli G et al. 2003) (Figura 9).



**Figura 9:** Fisiopatologia della cachessia neoplastica.



Il riconoscimento della cachessia neoplastica richiede lo studio delle molteplici “dimensioni” che la costituiscono. Una precoce ed accurata valutazione clinica globale del paziente è alla base della realizzazione di un intervento metabolico-nutrizionale tempestivo ed appropriato. La valutazione nutrizionale del paziente neoplastico deve essere effettuata utilizzando protocolli adeguati di screening e valutazione dello stato di nutrizione (*Body JJ 1999*).

### ***Valutazione dello stato funzionale***

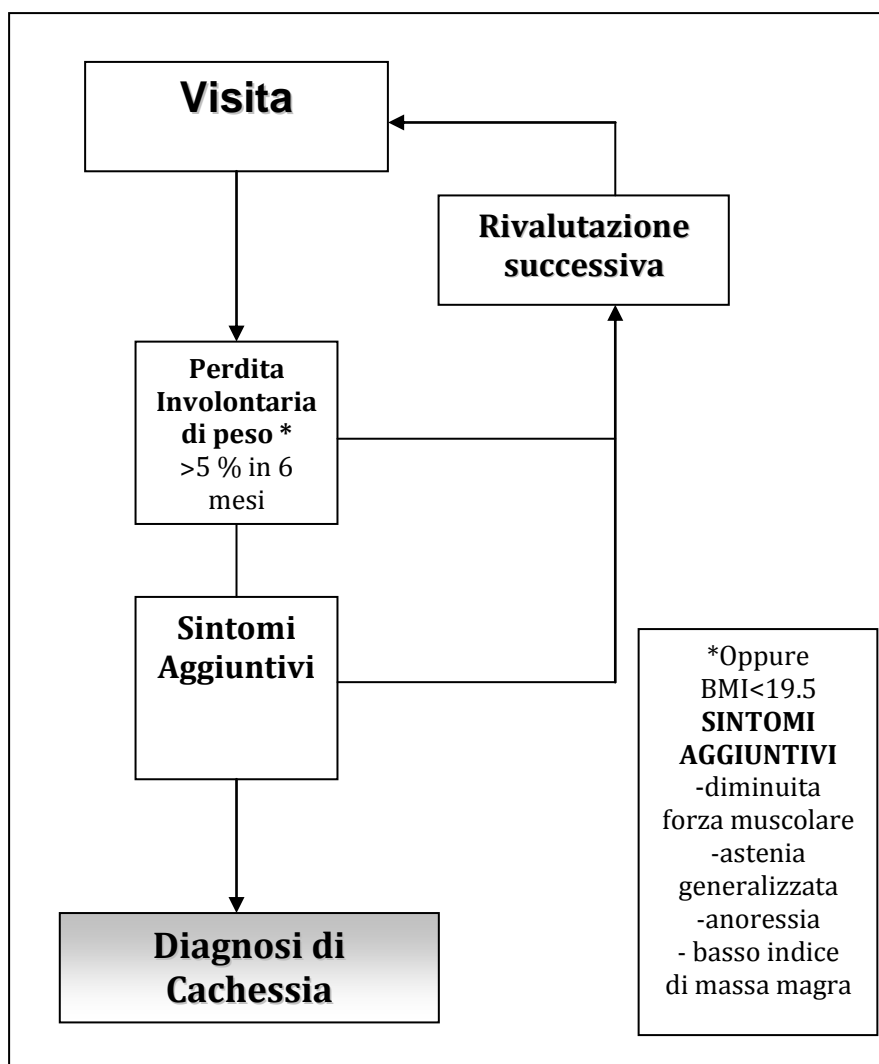
***Parametri di laboratorio:*** è ormai accertata l'importanza delle citochine pro infiammatorie (in particolare IL-6 e TNF- $\alpha$  determinate a livello sierico con metodica immunoenzimatica), nella cachessia quale espressione della infiammazione cronica sempre presente in questa situazione e quindi il loro livello sierico andrebbe effettuato in tutti i reparti dove vengono seguiti pazienti cachettici. Il dosaggio di ormoni regolatori dell'appetito e dell'introito energetico, quali la leptina ed eventualmente ghrelin, deve essere invece riservato a scopi di ricerca. La valutazione dello stress ossidativo, parametro significativo nello studio della cachessia, può essere eseguita con la determinazione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) eseguibile su sangue intero e dell'enzima antiossidante, Glutazione Perossidasi (*Davis MP 2003*).

### ***Criteri diagnostici per la definizione e stadiazione della cachessia***

Come già affermato in precedenza l'evoluzione verso la cachessia neoplastica deve essere sospettata se viene osservata una perdita *involontaria* di peso superiore al 5% del peso pre-malattia nell'arco di 6 mesi, indipendentemente da uno stato edematoso, in presenza di neoplasia. Nei casi in cui la perdita di peso non è documentabile, è sufficiente un BMI <19,5. Secondo i *criteri della Cachexia Consensus Working Group* per la diagnosi di cachessia neoplastica è necessaria, oltre alla perdita involontaria di peso superiore al 5% del peso pre-malattia nell'arco di 6 mesi, la compresenza di almeno tre dei seguenti reperti: diminuita forza muscolare, fatigue, anoressia, basso indice di massa magra, alterazioni biochimiche: aumentati marcatori infiammatori (citochine), anemia (< 12 g/dl), bassa albuminemia (< 3.2 g/dl). Infine, devono essere escluse le seguenti situazioni: inanizione, sindrome da malassorbimento (non conseguente a radio-

chemioterapia), depressione primaria, ipertiroidismo, perdita di tessuto muscolare correlata all'età (sarcopenia). Tale percorso diagnostico viene schematizzato nell' algoritmo di seguito (Davis MP 2003)(Figura 10).

Recentemente alcuni autori hanno evidenziato l'opportunità di mettere a punto una classificazione della cachessia, combinando criteri antropometrici e parametri nutrizionali, infiammatori ed ormonali, che permetta di attuarne una "stadiazione": il primo stadio, definito come "pre-cachessia" solo una perdita di peso involontaria (>5%), il secondo, definito come "sindrome cachettica", associa anche la riduzione dell'introito alimentare e l'aumento degli indici sierici di infiammazione, nell'ultimo, definito come "cachessia severa" sono presenti, oltre ai precedenti, anche la perdita di massa magra, di massa grassa e l'immunodeficienza (Body JJ 1999).



**Figura 10:** Algoritmo diagnostico della cachessia neoplastica

### ***Parametri prognostici***

Recentemente è stato sviluppato un punteggio “inflammation-based” derivato dai valori di proteina C reattiva (PCR) e di albumina denominato Glasgow prognostic score (GPS) che è considerato prognostico e predittivo della progressione di malattia e della sopravvivenza in particolare in pazienti neoplastici affetti da cachessia. Il GPS è calcolato nel modo seguente: ai pazienti con valori elevati di PCR (>10 mg/l) e ipoalbuminemia (<35 g/l) viene attribuito un punteggio pari a 2; ai pazienti in cui uno solo di questi due parametri è alterato viene attribuito un punteggio pari a 1; ai pazienti con nessuna alterazione un punteggio 0. La maggior parte dei pazienti neoplastici in stadio avanzato di malattia ha un punteggio pari a 1 risultante da elevati livelli di PCR a sottolineare il ruolo prognostico dell’infiammazione cronica. Il ruolo predittivo di sopravvivenza dei parametri nutrizionali è confermato anche dalla presenza dell’anoressia, quale fattore prognostico indipendente, all’interno del “Palliative Prognostic Score”, prodotto da un gruppo di ricerca italiano (Davis MP 2003).

### ***MUSCLE RING- FINGER PROTEIN-1 (MuRF -1)***

La progressiva perdita di massa muscolare è la caratteristica clinica della cachessia più seria, sostanzialmente non reversibile con i comuni trattamenti nutrizionali, metabolici e farmacologici. Sebbene la patogenesi della perdita di massa muscolare non sia stata ancora completamente chiarita, essa è certamente multifattoriale e riflette un disequilibrio tra velocità di sintesi e di degradazione proteica a livello muscolare.

Il ruolo giocato dal sistema proteolitico della ubiquitina/proteasoma ATP-dipendente nell’accelerata degradazione proteica muscolare è stato largamente documentato e questo ha permesso di identificare il sistema proteolitico muscolare, come potenziale bersaglio di interventi terapeutici mirati per ridurre l’entità della cachessia.

Per la via di degradazione proteolitica del proteasoma sono indispensabili 3 proteine: E1, E2 ed E3. Queste sono in grado di legarsi alla proteina target e di cedervi molecole di ubiquitina, fino a formare una catena di poliubiquitina. La fase cruciale di questo processo è il riconoscimento delle proteine da eliminare da

parte di E2 ed E3, mentre E1 fornisce per primo l'ubiquitina alle altre componenti del sistema. Il meccanismo di poliubiquitinizzazione può variare a seconda del tipo di proteine E2 ed E3 coinvolte. Il riconoscimento da parte del proteasoma delle proteine da degradare è di tipo aspecifico: esso infatti le individua soltanto per il fatto che sono legate alla catena di poliubiquitina. Successivamente, il complesso, srotola la proteina e la degrada. Una volta avvenuta la proteolisi, le molecole di poliubiquitina vengono depolimerizzate per essere riciclate, per mezzo della famiglia proteica delle DUBs.

Il sito attivo del proteasoma è costituito da residui di treonina attivi, appartenenti ad alcune subunità  $\beta$  dei rings centrali; queste treonine sono responsabili del taglio proteolitico che avviene per cessione del loro gruppo ossidrilico. In virtù della diversa costituzione delle varie subunità  $\beta$ , il taglio proteolitico può avvenire accanto ad un aminoacido idrofobico, basico oppure acido. Per evitare danni cellulari, le varie subunità  $\beta$  vengono all'inizio sintetizzate sottoforma di precursori inattivi (pre- $\beta$ ), dotate di un peptide aggiuntivo all'estremità N-terminale e, solo dopo il completo assemblaggio dei 2 rings, verranno attivate tramite taglio proteolitico.

Ad oggi non è chiaro come cooperano le differenti E3 ligasi che sono coesprese nei tessuti del muscolo striato, MuRF1 e i due analoghi MuRF2 e MuRF3.

MuRF-1 è una proteina contenente un anello nella porzione aminoterminale e due domini *coiled-coil* nella regione centrale. Il dominio ad anello è il responsabile dell'attività di coniugazione con l'ubiquitina (*Lecker 2003*).

MuRF-1 e altri membri della famiglia MuRF sono stati ritrovati in associazione con le componenti miofibrillari, titina e linea M. Ciò aumenta la possibilità di considerarli come dei componenti target dell'apparato miofibrillare per la degradazione nell'atrofia muscolare.

Ci sono anche indicazioni che MuRF-1 è stato trovato nei nuclei delle cellule muscolari (*Lecker 2003*).

MuRF-1 è coinvolto nella regolazione omeostatica energetica e nel metabolismo degli aminoacidi, forse attraverso la degradazione di M-CK, un enzima critico per il metabolismo energetico, che produce reversibilmente fosfocreatina e ATP, che si verifica in condizioni di atrofia muscolare indotta, come nella cachessia. In condizioni di deperimento, il muscolo scheletrico, organo che consuma più ATP,

deve ridurre il suo consumo energetico. Questo potrebbe essere ottenuto dalla degradazione di M-CK, in seguito alla sua ubiquitinazione da parte di MuRF-1.

E' stato riportato recentemente che l'espressione di MuRF-1 aumenta in diverse condizioni patologiche caratterizzate da atrofia muscolare, quali la cachessia (*Yamamoto, Ikeshita et al. 2008*).

## **OBESITA'**

L'obesità è una patologia che sta assumendo una caratteristica pandemica, tanto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'ha definita come la principale minaccia per la salute della popolazione dei Paesi Occidentali. Sebbene quelli industrializzati siano i paesi più colpiti, l'obesità si sta ormai diffondendo anche nei paesi poveri e in via di sviluppo. Secondo recenti stime della *World Health Organization*, gli individui (con più di 20 anni) in sovrappeso risultavano essere 1,5 miliardi nel 2008 e di questi 200 milioni di uomini e circa 300 milioni di donne sono patologicamente obesi ([www.who.int/bmi/index.jsp](http://www.who.int/bmi/index.jsp) 2012); inoltre le proiezioni mostrano che, per il 2015, gli adulti in sovrappeso saranno circa 2,3 miliardi e gli obesi più di 700 milioni.

L'obesità e il sovrappeso sono ormai riconosciuti come veri e propri problemi di salute pubblica rappresentando uno dei maggiori fattori di rischio per patologie croniche quali il diabete mellito di tipo II, le patologie cardiovascolari, l'ipertensione, la dislipidemia, l'osteoartrite, le apnee notturne e alcuni tipi di tumori; sono inoltre associati a un maggiore rischio di morte prematura.

La condizione di eccesso ponderale è infatti il quinto fattore di rischio per i decessi a livello mondiale, causando ogni anno la morte di circa 2,8 milioni di adulti.

I depositi di grasso più rischiosi sono quelli di tipo addomino-viscerale. L'accumulo di tessuto adiposo a questo livello è modulato da diversi fattori, ma sembra che un ruolo fondamentale sia svolto dagli androgeni e dagli estrogeni prodotti dalle gonadi e dalle ghiandole surrenali e dalla conversione dell'androstenedione a estrone negli adipociti stessi (*Bray 2004*).

La diffusione dell'obesità sembra l'inevitabile conseguenza della presenza di una popolazione geneticamente preselezionata al risparmio energetico (al deposito di tessuto adiposo) che invece si trova a vivere in un ambiente sedentario e con abbondanza di cibi ad alta densità energetica. L'obesità infatti deriva da uno squilibrio tra l'energia introdotta e il dispendio energetico, quindi da una eccessiva introduzione di cibo o da una ridotta spesa energetica o da una combinazione di entrambi questi fattori (*Speakman 2004*). L'energia in eccesso viene depositata come grasso soprattutto negli adipociti del tessuto adiposo sottocutaneo e della cavità intraperitoneale (viscerale), ma nei soggetti obesi i lipidi possono essere accumulati anche nel fegato e in altri organi. Gli adipociti possono aumentare il

loro volume o il loro numero; l'iperplasia e l'ipertrofia del tessuto adiposo sono responsabili delle patologie legate all'obesità. L'iperplasia infatti è responsabile di tutti quei problemi legati al peso della massa adiposa, come l'osteoartrite e i problemi respiratori; l'iperplasia e l'ipertrofia invece si accompagnano ad un aumento nella liberazione di acidi grassi liberi e della secrezione di citochine e adipochine coinvolte nella comparsa di diabete mellito di tipo II, ipertensione, patologie cardiovascolari e alcune forme di tumori (Bray 2004).

L'obesità infantile suscita molta preoccupazione avendo raggiunto livelli allarmanti: nel 2010, circa 43 milioni di bambini sotto i 5 anni di età sono stati stimati in sovrappeso e di questi circa 35 milioni vivono in Paesi in via di sviluppo. La gravità della diffusione dell'obesità infantile sta anche nel fatto che i bambini obesi rischiano di diventare adulti obesi (De Marchi et al. 2007).

Negli adulti, sovrappeso e obesità vengono definiti in base ai valori di BMI seguendo una specifica classificazione unificata per genere ed età.

Il valore soglia del BMI per il sovrappeso è 25 e per l'obesità è 30, stabiliti in base al rischio di comorbidità. (Tabella 1)

Classificazione	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
	Cut-off principali
Sottopeso	< 18,50
Magrezza severa	<16,00
Magrezza moderata	16,00 - 16,99
Magrezza leggera	17,00 - 18,49
Normopeso	18,50 - 24,99
Sovrappeso	≥ 25,00
Pre-obesità	25,00 - 29,99
Obesità	≥ 30,00
Obesità I classe	30,00 - 34,99
Obesità II classe	35,00 - 39,99
Obesità III classe	≥ 40,00

**Tabella 1:** Classificazione internazionale del sottopeso, sovrappeso e obesità nell'adulto, secondo il BMI

Nei bambini e negli adolescenti la massa grassa non solo aumenta in valori assoluti con l'età, ma il suo rapporto con peso e altezza cambia fisiologicamente nel tempo e in maniera diversa fra i due sessi, rendendo la diagnosi di sovrappeso e obesità più problematica.

Di conseguenza in queste fascia di età non esiste e non può esistere un unico valore soglia di BMI che definisca il sovrappeso o l'obesità, indipendentemente dall'età e dal sesso, come avviene per gli adulti. Dal 2000 anche in età evolutiva, è

stato applicato il principio di *cut off point* correlato alla clinica in seguito alla pubblicazione "*Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey*" di Cole et al. sui valori dei percentili di BMI che all'età di 18 anni corrispondono ai valori di BMI dell'adulto rispettivamente di 25 e 30. I percentili sono disponibili per la fascia di età da 2 a 18 anni per entrambi i generi. La scelta dei *cut off point* tuttavia non è l'unica problematica nella diagnosi dell'eccedenza ponderale in età pediatrica, in quanto anche la scelta delle curve di riferimento pone problemi pratici, teorici ed etici ancora più importanti. Fino al 2006 tutte le curve antropometriche pubblicate e utilizzate erano basate sulla semplice osservazione della crescita di gruppi di bambini, in apparente buona salute, in uno specifico luogo, in un determinato periodo di tempo, e che quindi risentivano di tutti i fattori positivi e negativi in grado di influenzare la crescita dei bambini. Tuttavia il concetto di "valori di riferimento" include quello di "normalità", di modello o di un obiettivo ideale o almeno desiderabile che non può essere certamente affidato o riconosciuto al modello di crescita osservato nella popolazione pediatrica di un unico Paese. Nel 2006, dopo oltre 10 anni di lavoro, l'Oms ha pubblicato gli standard di crescita per bambini dalla nascita a 5 anni di età basati su un approccio prescrittivo, cioè come i bambini potrebbero e dovrebbero crescere, se posti in un ambiente adeguato, privo di ostacoli nutrizionali, economici e sociali al raggiungimento del loro potenziale genetico di crescita. Queste curve di crescita sono state costruite su bambini allattati al seno almeno per 6 mesi, con introduzione di alimenti complementari graduale e adeguata, che vivono in ambiente privo di fumo, che possono facilmente accedere a cure pediatriche e a interventi preventivi come le vaccinazioni e le cui famiglie non hanno limitazioni economiche. Inoltre, le curve sono state validate clinicamente per verificare se adeguate alla diagnosi appropriata dello stato nutrizionale di bambini da zero a cinque anni di età e se possono, quindi, essere realmente considerate "curve standard", cioè un modello di crescita con cui confrontare la crescita di singoli o di gruppi di bambini (De marchi et al. 2007).

Nel 2007 l'Organizzazione mondiale della sanità ha anche pubblicato le curve di crescita da 5 a 19 anni, rivalutando con diverso approccio statistico dati antropometrici rilevati negli anni settanta. Il diverso background di costruzione delle curve di crescita e degli standard ha quindi suggerito diversi *cut off point* per la diagnosi di sovrappeso e obesità da zero a cinque anni e da cinque a diciannove:



- da 5 a 19 anni, sono stati confermati i principi statistico-clinici suggeriti da Cole e dalla *International Obesity Task Force (IOTF)*. Utilizzando le curve di crescita dell'Oms, il valore di BMI 25 a diciannove anni di età coincide con l'85° percentile (+ 1SD, Standard Deviation) e definisce lo stato di sovrappeso. Ugualmente il valore di BMI di 30 a diciannove anni di età coincide con il 97° percentile (+ 2SD) e quindi con la diagnosi di obesità

- per la fascia di età inferiore, da zero a cinque anni, l'approccio diagnostico è più cauto. I bambini con un BMI uguale o superiore all'85° percentile (+ 1SD) sono definiti "a rischio di obesità", quelli il cui BMI si trova sul 97° percentile (+ 2SD) o al di sopra sono definiti sovrappeso e, infine, i bambini con un BMI pari o maggiore al 99° percentile (+ 3SD) si considerano obesi. Questo approccio molto più prudente è legato al fatto che la diversa valutazione può essere dovuta anche a solo pochi chili di differenza e che con una diagnosi di obesità alcuni bambini potrebbero essere erroneamente posti a diete ipocaloriche.

In ogni caso, per una valutazione dinamica e adeguata dello stato nutrizionale, l'osservazione della variazione di percentile del parametro scelto (altezza, peso, BMI) a intervalli può rappresentare un metodo semplice e attendibile (*De marchi et al. 2007*).

Le indagini strumentali per misurare la composizione corporea e, quindi, anche la quantità di tessuto adiposo presente nel corpo quali la tac e la risonanza magnetica sono accurate ma costose e invasive in termini di radiazione assorbita. Non altrettanto può dirsi per la DEXA (Dual Energy X ray Absorbimetry), usata anche negli esami preventivi per l'osteoporosi, purché munita di un software specifico per la composizione corporea, per la quale l'assorbimento di radiazioni è più basso e pari a quello di un volo intercontinentale. Lo studio della composizione corporea fatto con questi strumenti può essere indicato in soggetti clinicamente complicati o per ragioni di studio. Questo tipo di indagini non sono, invece, indicate per un utilizzo vasto in sanità pubblica e per studi epidemiologici. Un accenno a parte merita la bioimpedenziometria, largamente diffusa anche in ambiti non sanitari (come *beauty farm*, palestre, centri sportivi, ecc), inserita per lo più nelle bilance pesa persone. Inoltre, è bene rammentare che al fine della determinazione della massa grassa e magra (quest'ultima, costituita in prevalenza da massa muscolare) la bioimpedenziometria presenta elevati ambiti d'imprecisione specie negli individui con sottopeso ed eccesso ponderale.

Gli indici antropometrici sono meno accurati di quelli di laboratorio, ma ancora accettabili in termini di riproducibilità, più semplici ed economici.

L'indice più comunemente utilizzato è il *Body Mass Index* (BMI) o Indice di Massa Corporea (IMC) che si ottiene dal peso (in kg) diviso per la statura (in metri) elevata al quadrato ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Il BMI è un indice caratterizzato da una buona correlazione con la quantità di grasso corporeo, anche se non misura direttamente la massa grassa del soggetto, né come questa è distribuita nel corpo. Gli atleti, per esempio, possono avere dei valori di BMI elevati, pur non avendo un eccesso di grasso corporeo, ma una massa muscolare molto sviluppata. A parità di BMI l'accumulo di tessuto adiposo a livello dell'addome, inoltre, è associato a un maggior rischio di malattie cardiovascolari e ad anomalie metaboliche come l'iperinsulinemia e la dislipidemia. Nonostante i limiti, il BMI viene considerato un indice semplice da calcolare ed è internazionalmente accettato per la valutazione dello stato nutrizionale negli adulti e nei bambini.

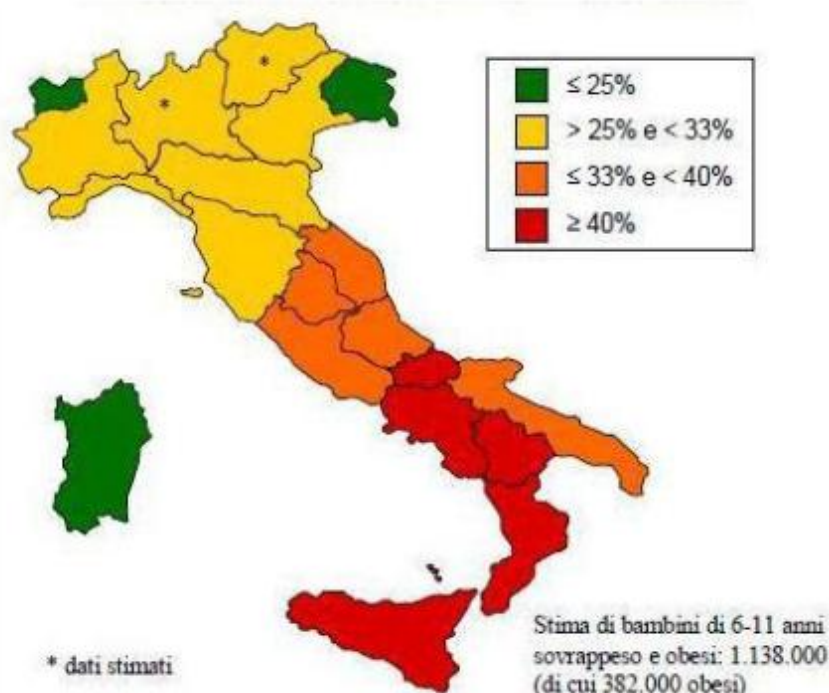
Altri metodi antropometrici per stimare la massa grassa e la distribuzione del tessuto adiposo nel corpo sono la misurazione delle pliche cutanee (che richiede però un elevato grado di addestramento), quella della circonferenza della vita, presa a metà tra l'arcata costale e la cresta iliaca (utile per identificare l'obesità addominale), e il calcolo del rapporto tra la circonferenza della vita e dei fianchi. (Klein, Allison et al. 2007).

Da un punto di vista economico, la diffusione dell'obesità porta a significativi effetti in termini di aumento dei costi che gravano sui sistemi sanitari nazionali e in termini di perdite di produttività per il sistema economico. Ciò determina un'esternalità negativa, e quindi un fallimento di mercato, associato ad un sovraconsumo di alimenti (Mazzocchi et al., 2009). Inoltre, l'interesse per questa patologia non si limita solo a paesi con una elevata incidenza di individui obesi sulla popolazione, ma riguarda anche diversi paesi europei, dove la percentuale degli individui in sovrappeso e obesi sta crescendo in maniera consistente (Who, 2012).

In Italia i livelli di obesità sono nettamente inferiori ad altri paesi europei (circa 10 % sul totale della popolazione, secondo i dati Who), ma il nostro paese presenta un'elevata diffusione di individui in sovrappeso e, quindi, potenzialmente a rischio. Inoltre, si rileva un dato preoccupante relativamente all'incidenza di bambini e adolescenti in sovrappeso e obesi (secondo i parametri

dell'*International Obesity Task Force*, un bambino su tre) (Mazzocchi, 2005), delineando in prospettiva un possibile significativo aumento delle malattie legate all'alimentazione nel prossimo futuro. Un altro aspetto interessante che si riscontra nella realtà italiana riguarda il dualismo geografico, cioè la forte discrepanza esistente fra i tassi di obesità nelle regioni meridionali, i più elevati, e quelli delle regioni settentrionali (Figura 11).

Un recente filone di ricerca, che emerge nella letteratura economica sulle problematiche dell'obesità, riguarda l'analisi delle caratteristiche socio-economiche dei consumatori che sono correlate a questa patologia.



**Figura 11:** Sovrappeso e obesità per Regione, bambini 8-9 anni (dati 2008, *Okkio alla SALUTE*)

Un primo gruppo di determinanti è relativo alle caratteristiche socio-demografiche dei consumatori. Nella diffusione dell'obesità, l'età assume un ruolo fondamentale, in quanto tale patologia, negli Stati Uniti, si riscontra principalmente negli uomini sopra i 65 anni e nelle donne tra i 65 e i 74 anni (Miljkovic et al., 2008) (Chang et al., 2006). Le donne, generalmente, presentano tassi di obesità maggiori rispetto agli uomini, ma la condizione di sovrappeso, invece, è maggiormente diffusa negli uomini (Miljkovic et al., 2008).

L'obesità risulta essere un problema che riguarda principalmente le categorie sociali svantaggiate, vale a dire la fascia di popolazione che presenta minori livelli di istruzione e maggiori difficoltà ad accedere all'assistenza medica, a causa dei bassi livelli di reddito (*Drewnowski e Darmon, 2005*).

Secondo uno studio di Loureiro e Nayga (*2005*), si riscontra una percentuale di obesità alquanto bassa fra la popolazione adulta con livelli di istruzione elevati e redditi medio-alti, mentre l'incidenza di individui obesi risulta nettamente più elevata in quella parte della popolazione che possiede solo un'istruzione elementare. Inoltre, il collegamento tra obesità, basso reddito e limitato grado di istruzione appare più evidente nelle donne.

Un altro gruppo di variabili collegate all'obesità riguarda le attitudini dei consumatori verso determinati stili di vita. In particolare, diversi studi, a questo proposito, delineano una relazione inversa tra attività fisica e BMI, sottolineando come le condizioni di obesità e sovrappeso si riscontrano maggiormente in individui scarsamente propensi all'attività sportiva (*Lakdawalla e Philipson, 2002*). Altri studi hanno analizzato la relazione tra BMI e fumo, mettendo in luce come l'essere fumatore riduce la probabilità di diventare obeso, in quanto accelera il metabolismo e induce il senso di sazietà (*Huffman e Rizov, 2008*).

Un terzo gruppo di variabili concerne le informazioni a disposizione del consumatore, esaminando come esse possano influenzare le scelte alimentari. Un consumatore scarsamente informato, infatti, non è in grado di ottimizzare le proprie preferenze ed è portato a compiere scelte errate per sé e per la propria salute. È importante non solo che gli alimenti riportino sulla confezione messaggi chiari e veritieri, ma che il consumatore abbia un livello di istruzione tale da poter comprendere l'etichetta e le informazioni nutrizionali, in modo da limitare le scelte insalubri (*Drichoutis et al., 2005 e 2008*).

Alcuni studi hanno messo in evidenza come un'informazione insufficiente non permetta di fare scelte consapevoli e favorisca un aumento dell'obesità. In questo senso, l'etichettatura assume un ruolo rilevante nel favorire scelte più consapevoli e ciò in particolare vale per l'etichettatura nutrizionale. Negli Stati Uniti, ad esempio, è stato osservato come l'etichettatura nutrizionale possa favorire una riduzione dei livelli di BMI e aiutare nella scelta di alimenti più salutari da un punto di vista nutrizionale (*Variyam, 2008*).

Infine, anche i contesti territoriali possono avere un'influenza sulla diffusione dell'obesità, tenendo presente, ad esempio, che in Italia nelle regioni del sud, nelle aree con reddito pro-capite più basso, i livelli di obesità sono maggiori di quelli che si rilevano nelle regioni del nord (Mazzocchi, 2005).

Facendo riferimento alle variabili trovate in letteratura, in un recente studio (Banterle e Cavaliere, 2009) si è sviluppata una *conceptual framework* al fine di analizzare le caratteristiche socio-economiche degli individui obesi nella realtà italiana e valutare le similarità con i risultati che si riscontrano in altre indagini empiriche. In tale *conceptual framework*, la variazione del BMI viene influenzata da 5 gruppi di variabili, vale a dire le variabili socio-demografiche, le variabili relative allo stile di vita, l'interesse per l'etichettatura nutrizionale, l'importanza degli attributi qualitativi dei prodotti alimentari e le variabili relative alla sicurezza alimentare. L'indagine empirica è stata condotta in Lombardia e ha portato alla costituzione di un campione di 955 consumatori, stratificato per genere, età e luogo di residenza (Banterle e Cavaliere, 2009). Dal punto di vista delle variabili socio-demografiche, i risultati dell'indagine condotta hanno evidenziato come l'obesità interessi in misura simile uomini e donne (48% uomini e 52% donne), mentre le differenze di genere sono più marcate per le persone in sovrappeso, rappresentate da uomini per il 65% e da donne per il 35%. In linea con i risultati rilevati in letteratura, nel campione analizzato si nota una crescita dei valori del BMI in funzione dell'età degli intervistati, quindi al crescere dell'età la quota di soggetti obesi aumenta. Nelle diverse classi di età i livelli medi di BMI risultano più elevati negli uomini rispetto alle donne. In particolare, per i primi si riscontrano valori di BMI medi superiori alla soglia del sovrappeso a partire dai 45 anni di età, mentre nel caso delle donne i valori di BMI rimangono nell'intervallo di normopeso nelle classi di età tra i 18 e i 64 anni; solo nella fascia di età più avanzata per le donne si riscontra un valore medio di BMI superiore alla soglia del sovrappeso.

Un aspetto interessante che emerge nell'indagine riguarda la relazione tra BMI e livello di istruzione: mentre per i normopeso la percentuale più elevata si riscontra tra gli individui che hanno la licenza media superiore (42%), nei sovrappeso la percentuale è simile tra quelli che possiedono la licenza media inferiore e coloro che hanno la licenza media superiore (intorno al 33%). Al contrario, si rileva una relazione inversa tra obesità e istruzione, in quanto la

percentuale degli obesi aumenta con la diminuzione del titolo di studio (escludendo la licenza elementare) ed è più alta tra gli intervistati che hanno solo la licenza media (46%) (Figura 3).

Per quanto riguarda il nucleo familiare, i risultati hanno sottolineato come le persone che vivono in nuclei familiari numerosi presentino livelli di BMI maggiori rispetto alle persone single o divorziate. Passando alle attitudini dei consumatori verso determinati stili di vita, come si è riscontrato in letteratura, è evidenziata una correlazione negativa tra obesità e attività fisica, infatti chi pratica sport presenta livelli di BMI più bassi rispetto a chi conduce una vita sedentaria (Mazzocchi 2005).

Analizzando l'importanza che i consumatori intervistati attribuiscono ai nutritional claims e all'etichettatura nutrizionale, i risultati dell'indagine svolta, a livello descrittivo, evidenziano un maggior interesse delle persone obese rispetto agli individui normopeso per alcuni claims nutrizionali relativi al basso contenuto in zucchero, al basso contenuto in grassi, al basso contenuto calorico, occorre tenere in debita considerazione le loro possibili ripercussioni sul reddito dei consumatori.

Relativamente all'interesse dei consumatori intervistati per gli attributi qualitativi dei prodotti alimentari (come origine dei prodotti, tracciabilità, proprietà nutrizionali, ecc.), dall'analisi emerge una correlazione negativa fra l'importanza assegnata a questi attributi e la condizione di obesità. In altri termini, gli individui obesi intervistati non mostrano un particolare interesse per gli attributi qualitativi degli alimenti, al contrario dei consumatori normopeso che invece appaiono interessati a questo tipo di caratteristiche. Un discorso analogo vale anche per attributi come prezzo, marca, e sapore, per i quali si rileva una correlazione negativa con il BMI, evidenziando, anche in questo caso, come un soggetto obeso, durante il processo di scelta di un prodotto alimentare, non concentri l'attenzione su questo tipo di caratteristiche del prodotto (Mazzocchi, 2005).

### **LIPINA 1**

La lipina 1, identificata nel 2001 mediante clonaggio posizionale del gene responsabile della lipodistrofia nei topi *fld* (fatty liver dystrophy) (Peterfy, Phan et al. 2001), generalmente è espressa a livelli più alti nel WAT, nel BAT, nei muscoli

scheletrici e nei testicoli ed è anche rintracciabile nel fegato, nei nervi periferici, nel cervello, nei reni e nelle cellule pancreatiche di tipo beta.

I topi *fld* hanno due caratteristiche principali: la presenza di steatosi epatica nelle prime due settimane di vita e il successivo sviluppo di neuropatia periferica, caratterizzata dalla presenza di una guaina mielinica poco compatta, di cellule di Schwann anormali e di segni di demielinizzazione (Langner, Birkenmeier et al. 1991). I topi *fld* non possiedono depositi di tessuto adiposo in nessuna parte del corpo: non presentano WAT viscerale nè WAT sottocutaneo nè BAT a livello interscapolare (Reue, Xu et al. 2000). Questo fenotipo ricorda alcune forme di lipodistrofia generalizzata umana, ma differisce per due motivi: la steatosi epatica è generalmente cronica nell'uomo, mentre è transiente nei topi *fld*, e la neuropatia periferica è presente solo in una sottopopolazione di pazienti umani (Garg 2004). I topi *fld* sono deficienti della lipina 1, a causa di una mutazione nonsense nel gene *Lpin1* (Peterfy, Phan et al. 2001).

Nei mammiferi ci sono tre membri della famiglia genica della lipina, che codificano per quattro isoforme proteiche. Le due isoforme proteiche della lipina 1 sono generate tramite splicing alternativo, che dà origine a proteine di circa 98 e 102 kDa (Peterfy, Phan et al. 2005). La lipina 2 e la lipina 3 sono state identificate tramite analisi di similarità di sequenza con la lipina 1 (44-48% di identità di amminocidi) (Peterfy, Phan et al. 2001). I tre geni della lipina di mammifero differiscono nel loro profilo di espressione tissutale, suggerendone ruoli fisiologici distinti. La lipina 2 è espressa principalmente nel fegato e nel cervello, mentre la lipina 3 è presente a bassi livelli in diversi tessuti, specialmente nell'intestino tenue e nel fegato (Donkor, Sariahmetoglu et al. 2007). Il ruolo fisiologico di queste due proteine è tuttavia ancora poco caratterizzato.

I geni ortologhi della lipina sono conservati anche in molte altre specie, suggerendone un ruolo biologico fondamentale. I pesci e le piante sembrano avere due geni correlati alla lipina; anche nematodi, *Drosophila*, *Plasmodium* e lievito presentano un gene ortologo alla lipina. Le proteine di quasi ogni specie possiedono un segnale di localizzazione nucleare e diversi siti putativi di fosforilazione. Inoltre, i lunghi domini amino e carbossiterminale (i domini N-LIP e C-LIP) sono altamente conservati tra tutte le proteine e in tutti gli organismi, il dominio C-LIP contiene il motivo attivo per la funzione enzimatica e di coattivatore trascrizionale.

***Ruolo nell'adipogenesi***

Studi condotti in vivo, su topi con deficit di lipina 1, e *in vitro* hanno messo in evidenza che la lipina 1 è necessaria per la differenziazione adipocitaria. Le analisi di espressione genica su fibroblasti in coltura di topi *fld* hanno rivelato un'alterazione nell'induzione del programma di trascrizione adipogenico. Le cellule mancanti della proteina non riescono a indurre l'espressione dei fattori trascrizionali chiave, quali PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ , e dei loro geni target. Invece, esprimono alti livelli di Pref-1, un inibitore dell'adipogenesi. La complementazione dei preadipociti con deficit in lipina 1 con un vettore retrovirale che esprime PPAR $\gamma$  recupera parzialmente il differenziamento adipocitario, indicando che la lipina 1 potrebbe essere richiesta a monte dell'espressione di PPAR $\gamma$  (Phan, Peterfy et al. 2004). In accordo con questa possibilità l'espressione della lipina 1 viene indotta in due momenti distinti, durante la differenziazione della linea cellulare preadipocitaria 3T3-L1. La proteina viene espressa transientemente dopo 10 e 20 ore dall'induzione della differenziazione, prima dell'espressione di PPAR $\gamma$  e dopo essere ritornata a livello basale, aumenta di nuovo a due giorni dall'induzione e raggiunge i massimi livelli negli adipociti maturi. Questo profilo bifasico suggerisce che la lipina 1 ha un ruolo nello stabilire il programma di espressione genica nella differenziazione precoce e un ruolo, più tardivo, nel mantenere il fenotipo degli adipociti maturi.

Un'ulteriore complessità è conferita dall'espressione delle isoforme proteiche: la lipina 1 $\alpha$  e la lipina 1 $\beta$ , che sembrano avere funzioni distinte negli adipociti, con diverse dinamiche di espressione, localizzazione subcellulare e di effetti sull'espressione genica. Con il progredire della differenziazione adipocitaria, i livelli di lipina 1 $\alpha$  diminuiscono, mentre i livelli di lipina 1 $\beta$  aumentano: pertanto, la lipina 1 $\beta$  risulta essere la forma predominante negli adipociti maturi. Entrambe le isoforme possono localizzarsi nel citoplasma e nel nucleo: tuttavia, negli adipociti maturi, la lipina 1 $\alpha$  è presente principalmente nel nucleo, mentre la lipina 1 $\beta$  tende ad essere prevalentemente citoplasmatica.

La lipina 1 $\alpha$  e la lipina 1 $\beta$  hanno anche effetti diversi sull'espressione genica degli adipociti. La complementazione dei fibroblasti embrionali di topi *fld* con un vettore di espressione retrovirale che esprimeva la lipina 1 $\alpha$  ha portato all'induzione di geni adipogenici, quali PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ . Al contrario, la presenza di lipina 1 $\beta$  induceva i geni lipogenici, come l'acido grasso sintasi, la stearyl-CoA



desaturasi 1 e la diacilglicerolo aciltransferasi, seppur tale effetto, in misura minore, fosse presente anche per la lipina 1 $\alpha$ . Le due isoforme sembrerebbero quindi avere ruoli complementari durante la conversione dei preadipociti in adipociti maturi (Peterfy, Phan et al. 2005).

### **TRATTAMENTO DELL'OBESITA'**

Una riduzione del 5-10% del peso corporeo in soggetti sovrappeso e obesi è associata a una riduzione del rischio cardiovascolare e dell'incidenza di diabete di tipo II, e a una riduzione della mortalità. Il principale trattamento dell'obesità consiste in una restrizione degli introiti alimentari e in una modificazione dello stile di vita del soggetto; il successo di questi interventi è purtroppo scarso, con un progressivo recupero del peso corporeo nel tempo (Avenell, Brown et al. 2004). La terapia farmacologica è prevista solo per alcune tipologie di pazienti e comprendeva negli anni l'orlistat, la sibutramina e il rimonabant.

Acomplia (principio attivo rimonabant, antagonista del recettore CB1 degli endocannabinoidi) è stato ritirato dal commercio nell'ottobre del 2008 per disposizione dell'*Agenzia Italiana del Farmaco* a seguito della conferma, da parte del comitato per i medicinali per uso umano dell'*EMEA (Agenzia Europea per i medicinali)*, dell'elevatissimo rischio di effetti collaterali a livello psichico dovuti alla sua assunzione. All'epoca il farmaco, in commercio in Europa dal 2006, aveva fatto il proprio ingresso nelle nostre farmacie da soli cinque mesi (nel maggio 2008) e veniva usato dietro controllo medico come terapia aggiuntiva a dieta ed esercizio fisico. Gli effetti avversi emersi erano soprattutto nausea, vertigini, diarrea e insonnia, ma in alcuni studi era stato necessario sospendere il farmaco per la comparsa di disturbi psichiatrici, in modo particolare crisi depressive. Rispetto al placebo, rimonabant riduceva il peso corporeo di 4,6 kg e migliorava il profilo lipidico, aumentando il valore plasmatico delle HDL e riducendo quello dei trigliceridi, ma sembrava non avere effetti sui valori di LDL e sulla pressione arteriosa (Van Gaal, Rissanen et al. 2005) (Pi-Sunyer, Aronne et al. 2006).

La sibutramina è stata sospesa in Europa dall'*EMEA* nel gennaio 2010, sulla base dei dati emersi dallo studio *SCOUT* che ha evidenziato la comparsa di un maggior numero di eventi cardiovascolari e cerebrovascolari non fatali in pazienti con anamnesi di malattie cardiovascolari e diabete. La decisione di sospendere la

vendita di farmaci a base di sibutramina è avvenuta in seguito ad un aumento delle problematiche cardiovascolari accusate da chi faceva uso del farmaco.

La sibutramina, farmaco ad azione centrale, inizialmente era stato sviluppato come antidepressivo; inibitore del riassorbimento di serotonina e noradrenalina agiva aumentando il senso di sazietà. La sibutramina subiva un marcato effetto di primo passaggio epatico, dove veniva metabolizzata soprattutto ad opera del citocromo P4503A4 in metaboliti attivi con potenza superiore a quella della sibutramina stessa (*Lean 2001*). Gli effetti collaterali più frequenti erano insonnia, nausea, secchezza della bocca e stipsi. Nel 2002 questo farmaco era stato temporaneamente sospeso dal commercio in Italia in seguito a due casi di morte per eventi cardiovascolari e sottoposto a revisione da parte dell'EMA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*); alla conclusione delle indagini il farmaco era stato nuovamente autorizzato alla vendita poiché il rapporto rischio-beneficio era stato valutato come favorevole, ma doveva essere utilizzato solo dietro prescrizione di un medico specialista per un periodo continuativo di massimo 30 giorni e non era indicato per pazienti con ipertensione non controllata, tachicardia o precedenti eventi cardiovascolari (*Nisoli and Carruba 2003*) ([www.emea.eu.int](http://www.emea.eu.int)). Il calo ponderale associato all'utilizzo della sibutramina per un anno era del 4,6% e l'efficacia del trattamento era maggiore quando il soggetto modificava il proprio stile di vita e veniva inserito in un programma di controlli regolari. Alla perdita di peso seguiva un aumento dei valori plasmatici delle HDL e una riduzione dei livelli plasmatici dei trigliceridi, senza miglioramento degli altri fattori di rischio (*Avenell, Brown et al. 2004*).

Il farmaco anti-obesità ideale dovrebbe avere tre caratteristiche: ridurre in modo significativo il peso corporeo e la rilevanza clinica delle patologie correlate all'obesità; avere un rapporto rischio-beneficio favorevole; avere un prezzo accessibile, poiché l'obesità è diffusa anche tra le classi sociali più povere (*Padwal and Majumdar 2007*).

Attualmente quindi l'unico composto disponibile in commercio è l'orlistat. L'orlistat è un inibitore delle lipasi gastriche e pancreatiche che riduce l'assorbimento dei lipidi introdotti con la dieta di circa il 30%. È un farmaco ad azione non sistemica (solo circa il 3% viene assorbito) che agisce nel tratto gastrointestinale; gli effetti collaterali sono quindi principalmente di tipo gastrointestinale. Le principali reazioni avverse sono lo sgocciolamento oleoso

anale, la flatulenza e l'incontinenza fecale; inoltre può essere ridotto l'assorbimento delle vitamine liposolubili, che può essere evitato con l'assunzione di integratori multivitaminici. Tali effetti sembrano essere ben tollerati dai pazienti e diminuiscono se associati ad una dieta a basso contenuto di lipidi. Dalla revisione della letteratura condotta dalla si evince che il trattamento con orlistat per un anno riduce il peso corporeo del 2,9%; inoltre riduce i livelli plasmatici del colesterolo totale e delle LDL, diminuisce la pressione arteriosa e favorisce il controllo della glicemia nei pazienti con diabete di tipo II, mentre nessun miglioramento è stato osservato nei valori plasmatici di HDL e trigliceridi (*Padwal, Li et al. 2003*).

Il calo ponderale che si può ottenere con l'attuale farmaco a disposizione è purtroppo modesto e la sospensione del trattamento farmacologico è spesso associata ad un recupero parziale o totale del peso corporeo iniziale; la ricerca di nuovi composti è quindi fondamentale per contrastare l'attuale "pandemia dell'obesità".

Sono diversi i composti in fase di studio per il trattamento dell'obesità, ma il loro meccanismo d'azione può essere ricondotto a: inibizione dell'assorbimento dei nutrienti; azione mimetica o potenziamento dei segnali periferici di sazietà o dei segnali di adiposità; incremento della spesa energetica o dell'utilizzazione dei substrati energetici; azione sui circuiti neuronali del sistema nervoso centrale coinvolti nel metabolismo energetico (*Wilding 2007*).

Tra i farmaci attualmente in commercio non ci sono composti che agiscono potenziando l'azione dei segnali periferici di sazietà, come il GLP-1, la CCK e il PYY<sub>3-36</sub>, o inibendo ghrelin, che induce l'assunzione di cibo. Tra gli analoghi del GLP-1, l'exenatide, usato per il trattamento del diabete mellito di tipo II, si è mostrato in grado di indurre una riduzione del peso corporeo, ma nonostante queste evidenze non è stata ulteriormente esplorata l'efficacia di questo composto, o di altri analoghi del GLP-1, come farmaco per il trattamento dell'obesità (*Wilding 2007*). Anche il recettore di ghrelin potrebbe rappresentare un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci; nel nostro laboratorio sono attualmente in fase di studio nuovi antagonisti o agonisti inversi del GHS-R1a per la loro attività anoressizzante. L'utilizzo di agonisti inversi del GHS-R potrebbe risultare particolarmente utile per controllare l'assunzione di cibo tra i pasti; l'attivazione costitutiva del GHS-R potrebbe infatti contribuire alla sensazione di fame che molti

soggetti avvertono tra un pasto e l'altro. Il blocco dell'attività intrinseca di tale recettore dovrebbe quindi incrementare la sensibilità ai segnali di sazietà come leptina, insulina e PYY<sub>3-36</sub> (Holst and Schwartz 2004).

## **TECNICHE CHIRURGICHE**

### **Chirurgia bariatrica**

Gli interventi chirurgici attualmente suffragati da dati di letteratura comprendenti casistiche sufficientemente ampie e follow-up adeguatamente prolungato sono i seguenti :

1) Interventi che limitano l'introduzione del cibo:

a) ad azione prevalentemente meccanica (interventi restrittivi):

- bendaggio gastrico regolabile
- gastroplastica verticale
- sleeve gastrectomy

b) ad azione prevalentemente funzionale:

- bypass gastrico e varianti

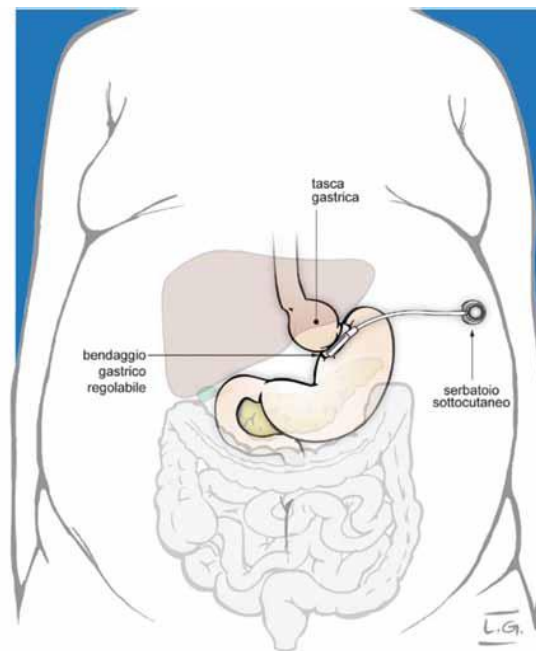
2) Interventi che limitano l'assorbimento dell'energia:

- diversione biliopancreatica secondo Scopinaro
- duodenal switch

### **Bendaggio gastrico**

Il bendaggio gastrico consiste nel posizionamento di una benda dotata di camera pneumatica attorno alla parte superiore dello stomaco, in regione sottocardiale, creando una tasca gastrica prossimale di dimensioni molto ridotte. Alla camera pneumatica è collegato un tubo in silicone che termina con un serbatoio che viene posizionato a livello sottocutaneo nella parete addominale e che permette la regolazione percutanea del calibro del bendaggio (Figura 12). L'intervento non modifica in modo definitivo l'anatomia dello stomaco ed è quindi completamente reversibile. Il bendaggio gastrico provoca un senso di sazietà precoce che riduce la quantità di cibo introdotto. Le complicanze operatorie gravi sono molto rare (0.2%) e la mortalità operatoria molto bassa (<0.1%). Le principali complicanze postoperatorie specifiche sono rappresentate da migrazione del bendaggio all'interno dello stomaco (<1%), dilatazione della tasca gastrica e scivolamento del

bendaggio (3%), deconnessione del port e/o del catetere con perdita di tenuta del sistema (3%).



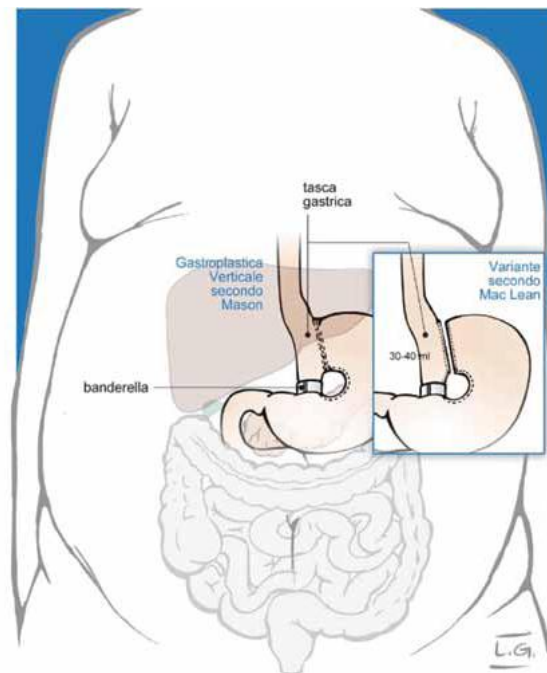
**Figura 12:** Bendaggio gastrico (SICOB 2006).

I risultati in termini di calo ponderale sono valutabili intorno al 40-50% dell'eccesso di peso. I risultati in termini di calo ponderale a lungo termine sono dipendenti in grado elevato dal comportamento alimentare del paziente e vi è un significativo numero di casi in cui si verifica ripresa ponderale.

### ***Gastroplastica verticale***

È il più antico degli interventi restrittivi e consiste nella partizione e riduzione del volume della sacca gastrica, mediante confezionamento di una tasca gastrica prossimale (15-20 cc) in comunicazione con il restante dello stomaco mediante un passaggio ristretto il cui diametro è reso fisso dal posizionamento di una benderella in polipropilene (Figura 13). La gastroplastica verticale riduce drasticamente la quantità di cibo che può essere introdotta e provoca un senso di sazietà precoce. La mortalità operatoria è bassa (0.1%). Le principali complicanze postoperatorie specifiche sono rappresentate da stenosi dello pseudopiloro (1-2%), dilatazione della tasca gastrica, reflusso gastroesofageo (1%). I risultati in termini di calo ponderale sono valutabili intorno al 60-70% dell'eccesso di peso. I risultati in termini di calo ponderale a lungo termine sono dipendenti in grado

elevato dal comportamento alimentare del paziente e vi è un significativo numero di casi in cui si verifica ripresa ponderale.

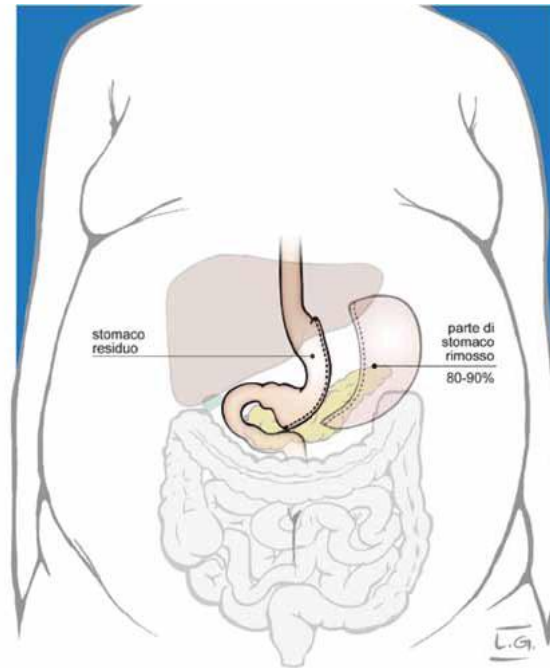


**Figura 13:** Gastroplastica verticale (SICOB 2006).

### ***Sleeve Gastrectomy***

È un intervento almeno parzialmente restrittivo che consiste nella sezione dello stomaco con rimozione di circa i 2/3 di esso. La sezione avviene parallelamente alla piccola curva in modo da creare uno stomaco di forma tubulare (Figura 14). L'intervento mira a ridurre drasticamente la quantità di cibo che può essere ingerita e provoca un senso di sazietà precoce. Tuttavia, la rimozione di una parte significativa dello stomaco e/o la modificazione della velocità di transito gastrico causano anche modificazioni della secrezione di enteroormoni ad azione di regolazione sul bilancio energetico e sul metabolismo glucidico. L'intervento è stato inizialmente introdotto come preparatorio di interventi successivi più complessi (duodenal switch) nei pazienti con gravi problemi cardio-respiratori e con BMI elevati, ma viene oggi proposto anche e prevalentemente come intervento isolato. La mortalità operatoria è circa dello 0.2% ed è specificamente sostenuta dalla creazione di fistole lungo la lunga sutura gastrica. Le principali complicanze postoperatorie specifiche sono rappresentate da dilatazione dello stomaco residuo

e reflusso gastro-esofageo. I risultati in termini di calo ponderale sono valutabili intorno al 60% dell'eccesso di peso. Non vi sono ancora risultati a lungo termine, ma è possibile vi sia un significativo numero di casi in cui si verifica ripresa ponderale ed in cui può essere richiesto il completamento dell'intervento mediante una procedura di revisione.

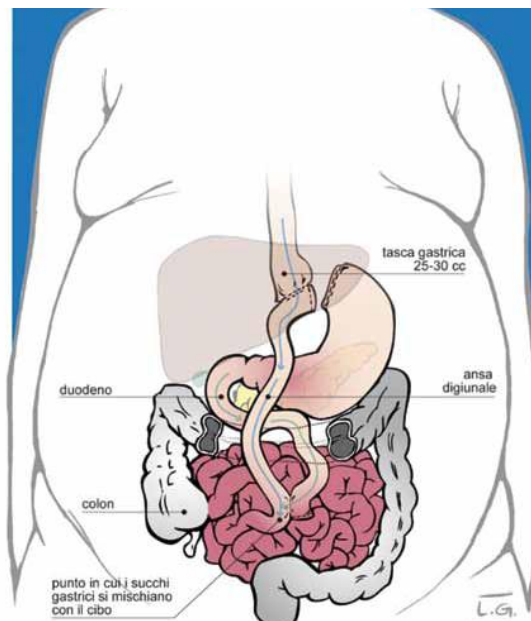


**Figura 14:** Sleeve gastrectomy (SICOB 2006).

### ***Bypass gastrico***

L'intervento consiste nella creazione di una tasca gastrica prossimale di 15-20 cc esclusa dalla restante porzione dello stomaco. A questa neotasca viene collegato il digiuno, andando quindi ad escludere dal transito degli alimenti la restante parte dello stomaco ed il duodeno (Figura 15). Il calo ponderale avviene in parte mediante un meccanismo restrittivo, ma anche a seguito della modificazione della secrezione di entero-ormoni ad azione di regolazione sul bilancio energetico e sul metabolismo glucidico. Può partecipare alla determinazione del calo ponderale la presenza di una dumping syndrome a seguito dell'assunzione bevande e/o cibi dolci. Non vi è un significativo malassorbimento per i macronutrienti (lipidi, glicidi, protidi) ma vi è un certo grado di malassorbimento per alcuni micronutrienti (Ca, Fe e VitB12).

Le complicanze operatorie gravi sono intorno al 2% e la mortalità operatoria è circa 0.5%. Le principali complicanze postoperatorie specifiche sono rappresentate da fistola anastomotica (1%), stenosi anastomotica (1.5%), ulcera anastomotica (3%), ernie interne (3%). Le possibili complicanze nutrizionali sono rappresentate da anemia multifattoriale (più frequentemente microcitica sideropenica) e da osteoporosi/osteomalacia. La prevenzione delle complicanze nutrizionali richiede supplementazione continuativa o periodica di durata indefinita (polivitaminici, calcio, vitamina D, vitamina B12 e ferro). I risultati in termini di calo ponderale sono valutabili intorno al 55-65% dell'eccesso di peso. Il calo ponderale è rapido nel primo anno. Le modificazioni della secrezione di ormoni dell'asse entero-insulare permette un rapido e specifico effetto di miglioramento del compenso metabolico nel paziente con diabete tipo 2.



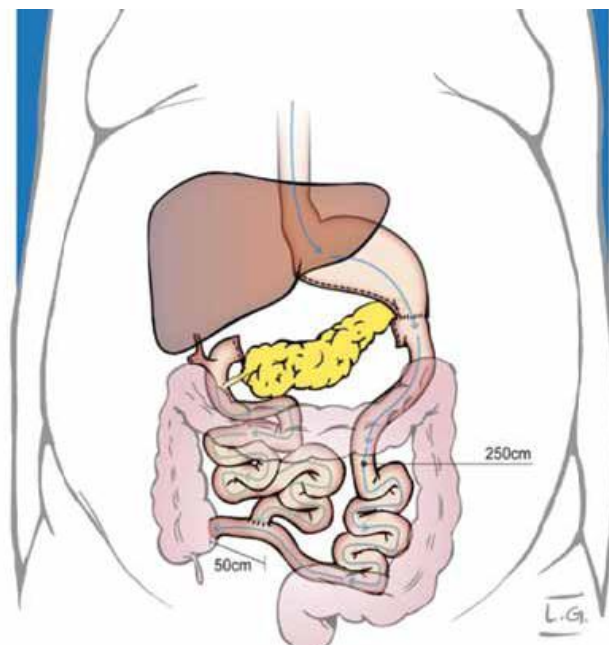
**Figura 15:** Bypass gastrico (SICOB 2006).

### ***Diversione biliopancreatica secondo Scopinaro***

È il capostipite degli interventi a meccanismo prevalentemente malassorbitivo e consiste nella riduzione del volume dello stomaco mediante gastrectomia subtotale e nel confezionamento di una derivazione interna intestinale, con confezionamento di una ansa alimentare di 250 cm e di una lunga ansa cieca bilio-digestiva che si abbocca alla precedente a 50 cm dalla valvola ileo-cecale (Figura 16). Viene quindi provocato un malassorbimento di alcuni principi nutritivi, ed in



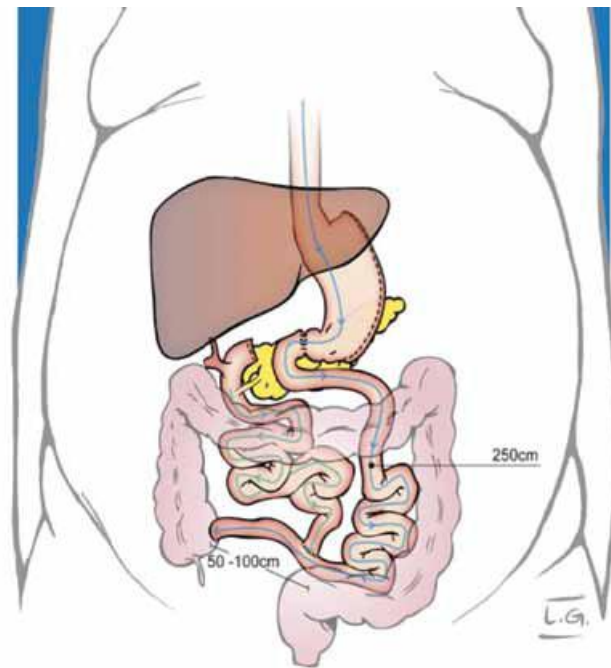
particolare dei grassi alimentari. Le complicanze operatorie gravi sono intorno al 5% e la mortalità operatoria è circa dell'1%. Le principali complicanze chirurgiche postoperatorie "specifiche" sono rappresentate da ulcera peptica post-anastomotica (incidenza 3.4%), stenosi anastomotica, occlusione dell'ansa biliodigestiva, ernie interne. Le complicanze nutrizionali, legate al meccanismo d'azione dell'intervento, sono più frequenti che nel bypass gastrico e comprendono malnutrizione proteicocalorica, anemia multifattoriale, demineralizzazione ossea, complicanze da deficit di vitamine liposolubili. La prevenzione delle complicanze nutrizionali richiede un adeguato apporto nutrizionale di proteine e una supplementazione continuativa o periodica di durata indefinita (polivitaminici, calcio, vitamina D, vitamina B12 e ferro). Sono frequenti sintomi da malassorbimento (diarrea, alitosi, flatulenza maleodorante) e complicanze proctologiche (emorroidi, ragadi, ascessi e fistole anali). I risultati in termini di calo ponderale sono valutabili intorno al 65-75% dell'eccesso di peso e sono molto stabili nel tempo. Le modificazioni della secrezione di ormoni dell'asse entero-insulare unitamente al malassorbimento lipidico permettono uno spiccato effetto di miglioramento del compenso metabolico nel paziente con diabete tipo 2.



**Figura 16:** Diversione biliopancreatica secondo Scopinaro(SICOB 2006).

### **Duodenal Switch**

È una variante della diversione biliopancreatica che consiste nella parziale riduzione del volume dello stomaco (mediante sleeve gastrectomy), nella conservazione del piloro e dei primi 3-4 cm di duodeno e nel confezionamento di una derivazione interna intestinale, con confezionamento di una ansa alimentare di 250 cm e di una lunga ansa cieca bilio-digestiva che si abbocca alla precedente a 50-100 cm dalla valvola ileo-cecale. L'anastomosi con l'ansa alimentare che nella diversione biliopancreatica classica è gastrodigiunale diventa in questo caso duodeno-digiunale e sub-pilorica, nel tentativo di limitare gli effetti collaterali dell'intervento (Figura 17). Meccanismo d'azione, mortalità, complicanze tardive chirurgiche e nutrizionale e risultati sono analoghi a quelli ottenibili con la diversione biliopancreatica classica.



**Figura 17:** Duodenal switch (SICOB 2006).

In Italia sono inoltre attualmente impiegate altre tecniche chirurgiche che per il loro uso limitato a pochi centri e/o per l'assenza di prolungati periodi di follow-up non possono essere considerate sufficientemente standardizzate (bypass bilio-intestinale, bypass gastrico su gastroplastica verticale secondo Amenta-Cariani, bypass gastrico tipo SuperMagen-strasse secondo Vassallo, bypass gastrico funzionale secondo Furbetta, plicatura gastrica). Sono da considerarsi inoltre tuttora in via di sviluppo ed investigazionali alcune procedure endoscopiche

(protesi intragastrica regolabile totalmente impiantabile, gastroplastica per via endoscopica, duodenaljejunal sleeve) le procedure di elettro-stimolazione gastrica e nuove procedure disegnate con lo scopo di amplificare gli effetti metabolici della chirurgia indipendentemente dal calo ponderale (bypass duodeno-digiunale, trasposizione ileale). Tra le prospettive future, vanno infine segnalate le possibilità che potrebbero essere offerte alla chirurgia bariatrica dalla *NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery)*, dalla *SILS (Single Incision Laparoscopic Surgery)* e dall'utilizzo della robotica.

Per tutti gli interventi di chirurgia dell'obesità è stata dimostrata la fattibilità per via laparoscopica. L'approccio laparoscopico dovrebbe essere considerato di prima scelta in chirurgia bariatrica. Dati provenienti da studi prospettici randomizzati hanno dimostrato che l'approccio laparoscopico è vantaggioso rispetto a quello open in termini di miglior decorso postoperatorio e di riduzione delle complicanze (*SICOB 2006*).

## ***Scopo***

Cachessia e obesità derivano da disfunzioni presenti a livello delle vie che regolano l'assunzione di cibo. Quest'ultima, è coordinata dall'interazione tra fattori neuronali e ormonali di origine periferica e specifiche aree cerebrali, quali quelle dell'ipotalamo, struttura deputata al controllo di tale funzione.

Tra i mediatori periferici coinvolti, un ruolo di primo piano spetta a ghrelin, un peptide endogeno sintetizzato e secreto principalmente dallo stomaco. Ghrelin oltre a stimolare efficacemente la secrezione di GH, svolge anche numerose attività extraendocrine, come quella di incrementare l'assunzione di cibo in numerose specie animali e nell'uomo attraverso l'interazione con il proprio recettore, il GHS-R1a.

Le proprietà di ghrelin sono condivise anche dai GHS composti sintetici di natura peptidica o non peptidica, che negli ultimi due decenni hanno destato particolare interesse in ambito endocrino grazie alla loro capacità di indurre il rilascio di GH. La scoperta che questi composti possono anche produrre effetti sul comportamento alimentare ha generato nuovi interessi nella comunità scientifica internazionale. Infatti, la possibilità di disporre di farmaci in grado di modulare l'assunzione di cibo è di notevole interesse per la possibile applicazione sia nelle forme di obesità che nelle condizioni caratterizzate da deficit di appetito, come nella cachessia.

Partendo da tali evidenze, lo scopo di questo lavoro è stato la ricerca e la caratterizzazione di nuovi composti peptidomimetici, analoghi di ghrelin e agonisti od antagonisti del GHS-R1a, che possano essere utilizzabili come validi strumenti terapeutici sia per la cachessia che per l'obesità di origine dietetica.

A tal fine, il progetto di ricerca è stato suddiviso in due parti: una prima con esperimenti condotti *in vitro* e una seconda con esperimenti *in vivo* sulla cachessia e sull'obesità.

Per gli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary*), una linea di cellule ovariche di criceto immortalizzate, transfettate stabilmente con un plasmide contenente la sequenza completa del gene per il GHS-R1a umano. L'effettiva riuscita della transfezione è stata valutata mediante RT-PCR e mediante microscopia a fluorescenza, coniugando cDNA codificante per il GHS-R1a a GFP (*green fluorescent protein*). Questi primi esperimenti sono stati utilizzati per selezionare, fra i vari composti in esame, quelli ad azione agonista o antagonista sul recettore GHS-R1a.

---

Per indurre la cachessia si è deciso di utilizzare il cisplatino, che è stato somministrato in ratti maschi adulti di ceppi Wistar per tre giorni all'inizio del trattamento. I composti agonisti sono stati somministrati due volte al giorno per undici giorni. In seguito al sacrificio sono stati prelevati da ogni animale i depositi adiposi perirenale, sottocutaneo ed epididimale e un campione di tessuto muscolare (muscolo bicipite femorale). Successivamente i depositi adiposi sono stati pesati al fine di determinare se il trattamento con i GHS possa influire sull'entità della massa grassa, poiché è noto dalla letteratura che sia ghrelin che alcuni GHS sintetici sono in grado di stimolare l'adiposità nell'animale da esperimento.

Uno degli aspetti clinicamente rilevanti della cachessia è la perdita di massa muscolare e, sebbene la patogenesi di tale fenomeno non sia ancora completamente chiarita, essa ha certamente una base multifattoriale e riflette un disequilibrio del turnover tra sintesi e degradazione delle proteine a livello muscolare. Diverse ricerche hanno ampiamente documentato il ruolo svolto nella degradazione proteica muscolare dal sistema proteolitico ATP-dipendente della ubiquitina/proteasoma, a cui appartiene anche il fattore *Muscle Ring-Finger Protein-1* (MuRF-1), una E3-ligasi. Poiché è riportato che l'espressione di MuRF-1 aumenta in diverse condizioni patologiche caratterizzate da atrofia muscolare, nella nostra ricerca abbiamo utilizzato la RT-PCR per verificare se il trattamento con GHS sia in grado di modificare l'espressione genica del fattore MuRF-1.

Nella seconda parte della ricerca abbiamo messo a punto un modello di induzione *in vivo* di obesità. Topi C57BL/6J, modello particolarmente responsivo all'insorgenza dell'obesità, sono stati utilizzati al fine di testare i composti risultati antagonisti del recettore GHS-R1a nella prima parte del lavoro. Nel nostro modello gli animali sono stati alimentati per nove settimane con una dieta contenente il 65% di grassi, alle quali ha fatto seguito il trattamento per due settimane con i composti antagonisti sopra citati. Durante il trattamento è stato costantemente monitorato l'andamento del peso corporeo e la quantità di cibo mangiato. Al termine del trattamento gli animali sono stati pesati, sacrificati ed è stata monitorata mediante tomografia a raggi X la massa grassa e magra.

In conclusione, i dati di questa ricerca ci permetteranno di valutare se il trattamento con i GHS potrà essere considerato come possibile strategia terapeutica per la cura della cachessia e dell'obesità.

## ***Materiali e Metodi***

## **REAGENTI**

I composti utilizzati sono stati sintetizzati tramite sintesi convenzionale in fase solida dal laboratorio del Prof. Martinex, presso l'*Istitut des Biomolécules Max Mousseron* dell'Università di Montpellier, Francia.

Ogni peptide è stato purificato mediante HPLC fino a una purezza superiore al 99%. I composti sono stati selezionati in base a studi di *binding* sul GHS-R1a; inoltre, nel nostro laboratorio, sono stati condotti studi preliminari per verificare l'attività dei composti sulla secrezione di GH: nessuno dei composti testati si è rivelato in grado di modificare la secrezione di GH basale o stimolata da hexarelin. Per avere una maggiore biodisponibilità orale, caratteristica molto importante per un potenziale impiego clinico, i composti prescelti hanno struttura non peptidica. Ghrelin e hexarelin sono stati sintetizzati tramite sintesi convenzionale in fase solida da *Neosystem* (Strasburgo, Francia).

Tutti i composti sono stati disciolti in soluzione fisiologica immediatamente prima della somministrazione.

Il cisplatino (cis-diamino dicloro platino, CDDP, Sigma) è stato disciolto in soluzione fisiologica.

## **COLTURE CELLULARI**

Per gli studi *in vitro* è stata utilizzata la linea cellulare immortalizzata CHO (*Chinese Hamster Ovary*), acquistata dalla Banca Cellule ICLC di Genova.

Le cellule sono state coltivate in Ham's F12 (contenente sodio piruvato 110 mg/l, rosso fenolo 1,2 mg/l, L-glutamina 2 mM, penicillina G 100 U/ml e streptomicina solfato 100 mg/ml), addizionato con 10% di FBS (*fetal bovine serum*), in un incubatore termostato a 37° C con 5% di CO<sub>2</sub>.

## **TRANSFEZIONE STABILE IN CELLULE CHO**

Le cellule CHO sono state transfettate con un plasmide per l'espressione stabile del gene per il GHS-R1a umano (UMR cDNA Resource Center, University of Missouri-Rolla, Rolla, MO; accession number AY429112).



La transfezione del plasmide nelle cellule è stata effettuata mediante l'utilizzo di Lipofectamina™ (Invitrogen Life Technologies).

Il giorno precedente la transfezione, le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di  $0,2 \times 10^6$  cellule per pozzetto in 2 ml di Ham's F12 e FBS al 10% e incubate a 37° C e con 5% CO<sub>2</sub>.

Il giorno della transfezione è stato preparato un mix costituito da DNA-Lipofectamina™ (2µg di DNA plasmidico contenente il GHS-R1a e 12 µl di Lipofectamina™ per ogni pozzetto) e Ham's F12 senza antibiotici e FBS, fino a raggiungere il volume finale di 200 µl. Al mix, lasciato ad incubare per 30 minuti a temperatura ambiente, sono stati successivamente aggiunti 300 µl di terreno, privo sia di antibiotici che di FBS. Dopo aver rimosso il terreno presente, sono stati aggiunti in ogni pozzetto altri 500 µl di Ham's F12 senza antibiotici e FBS, e 500 µl di mix DNA-Lipofectamina™.

Le piastre sono state quindi riposte nell'incubatore a 37° C per 5 ore; trascorso il tempo di incubazione, è stato aggiunto ad ogni pozzetto 1 ml di Ham's F12 contenente FBS al 20%. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato sostituito con Ham's F12, contenente FBS al 10%. A 72 ore dalla transfezione, le cellule sono state divise 1:10 e coltivate nel terreno di selezione costituito da HAM'S F12 completo con FBS al 10% e 800 µg/ml di G418 Solfato. La concentrazione idonea di G418 solfato è stata determinata attraverso una curva di sopravvivenza effettuata in precedenza su cellule CHO, in cui è stata determinata la minima concentrazione tossica di G418 per le cellule in questione (in questo caso 800 µg/ml).

### ***Selezione dei cloni***

Dopo avere individuato i cloni al microscopio, le cellule sono state lavate per due volte con D-PBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*), privo di calcio e magnesio. Successivamente è stato posizionato sopra ogni clone selezionato un dischetto assorbente imbevuto di tripsina; dopo un'incubazione di 5 minuti a 37° C, ciascun dischetto è stato trasferito in un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti contenente il terreno di selezione e FBS al 10%.

Raggiunta la confluenza, le cellule sono state gradualmente trasferite dapprima in una piastra da 12 pozzetti, poi in una da 6 pozzetti e infine in una piastra petri, in attesa di verificare l'espressione del gene transfettato.

### **MOBILIZZAZIONE DEL CALCIO INTRACELLULARE**

Le cellule transfettate con il GHS-R1a, coltivate in HAM'S F12 completo contenente FBS al 10% e 800 µg/ml di G418 Solfato, sono state piastrate (ad una densità di 20000 cellule per pozzetto) in una piastra da 96 pozzetti nera con fondo trasparente (Corning, NY, USA). Dopo 48 ore, le cellule sono state incubate in 100 µl di terreno HAM'S F12 (privo di FBS e di G418), al quale sono stati aggiunti, in sequenza, Probenecid 2.5 mM, (SIGMA), Fluo-4 AM 4.5 µM (Molecular Probes). Il Fluo-4 NW viene utilizzato come indicatore di fluorescenza, grazie alla sua capacità di attraversare la membrana cellulare; essendo tuttavia riconosciuto come molecola estranea, la cellula tende ad espellerlo attraverso i trasportatori di membrana; per questo motivo insieme al Fluo-4 NW viene usato il Probenecid, un inibitore di tali trasportatori. Le cellule sono state lasciate nell'incubatore per 45 minuti a 37 ° C e al 5% CO<sub>2</sub>. La lettura della piastra è stata effettuata mediante lo *spettrofotometro multifunzione VICTOR<sup>3</sup> (Perkin Elmer)*, all'interno del quale è inserito un iniettore che somministra 25 µl di soluzione in ogni singolo pozzetto della piastra nel quale si vuole effettuare la misurazione del flusso intracellulare di calcio. Le determinazioni di ghrelin e hexarelin sono state effettuate alla concentrazione finale di 10<sup>-8</sup> M, e 10<sup>-6</sup> M. I composti in esame sono stati testati singolarmente o in associazione ad hexarelin 10<sup>-6</sup> M; in questo secondo caso, sono stati aggiunti nei pozzetti, alla concentrazione di 10<sup>-6</sup> M 5 minuti prima dell'iniezione di hexarelin. In ogni pozzetto lo strumento effettua 80 letture, ogni secondo una dall'altra, prima, durante e dopo l'iniezione dello stimolo.

Per le letture è stata utilizzata la coppia di filtri eccitazione/emissione 485/535 nm.

I risultati sono stati espressi o come UFR (unità di fluorescenza) o come differenza di AUC (*area under the curve*), registrati prima e dopo l'iniezione degli stimoli.

## **MICROSCOPIA CONFOCALE**

La CLSM è una tecnica di microscopia ottica che permette di ottenere informazioni da sistemi biologici sia in termini spaziali che temporali ad un ottimo livello di risoluzione. Il principio su cui si basa la microscopia confocale consiste nell'illuminare il campione un punto alla volta, registrando la risposta, in riflessione o fluorescenza, della sola luce proveniente dal punto illuminato. Si ottiene così una notevole riduzione dei possibili contributi di fluorescenza provenienti da altre parti del campione, che nella microscopia convenzionale producono un effetto di sfocamento. Questo significa che piani a diverse profondità possono essere studiati distintamente poiché vengono minimizzate le informazioni fuori fuoco sovrapposte all'immagine. Si arriva in tal modo ad avere un insieme di immagini che rappresentano la struttura tridimensionale del campione in esame senza andare ad alterarne le proprietà fisiologiche.

L'analisi viene eseguita con un microscopio laser confocale (*Zeiss, LSM710, Germania*) su cellule transfettate stabilmente con il plasmide contenente la sequenza completa del gene per il GHS-R1a umano coniugato a *Green Fluorescent Protein*.

Le cellule sono state trattate con hexarelin per indurre internalizzazione del recettore. L'elaborazione dell'immagine viene effettuata mediante il *software ImageJ*.

## **DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI mRNA PER IL GHS-R 1A**

### ***Estrazione dell'RNA***

Le cellule sono state raccolte in 800 µl di soluzione Trizol-like a 4° C; la quantità di reagente aggiunta è sufficiente per l'estrazione dell'RNA da 5-10 10<sup>6</sup> cellule.

### **SOLUZIONE TRIZOL-LIKE**

- 9,453 gr di guanidio tiocianato (CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>CHNS)
- 3,045 gr di ammonio tiocianato (NH<sub>4</sub>SCN)
- 3,33 ml di sodio acetato (CH<sub>3</sub>COONa) 3 M, pH 5,2
- 38 ml di fenolo non saturato

- 5 ml di glicerolo
- portare a 100 ml con acqua sterile

I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 5 minuti, per garantire la completa dissociazione dei complessi delle nucleoproteine; sono stati poi aggiunti 200 µl di cloroformio e le provette sono state agitate vigorosamente per 15 secondi; dopo un'incubazione di 3 minuti a temperatura ambiente, sono state centrifugate a 12000 g per 15 minuti a 4 °C. Alla fine della centrifugazione si sono ottenute 3 fasi separate: la fase organica inferiore contenente il DNA, l'interfase contenente le proteine e la fase acquosa superiore contenente l'RNA. La fase acquosa è stata accuratamente recuperata e miscelata con 500 µl di isopropanolo a 4° C; i campioni, dopo agitazione vigorosa, sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugati di nuovo a 12000 g per 10 minuti a 4 °C, al fine di consentire la precipitazione dell'RNA totale. Dopo rimozione del sovrantante, i pellet ottenuti sono stati lavati con 200 µl ml di etanolo 75% e nuovamente centrifugati a 7500 g per 5 minuti, a 4 ° C. Dopo aver eliminato il sovrantante, l'etanolo residuo è stato fatto evaporare sotto cappa chimica per 2 minuti; l'RNA è stato quindi risospeso in un volume adeguato (25-30 µl) di formamide.

La concentrazione dell'RNA totale è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica.

Per valutare l'integrità degli RNA estratti, piccole aliquote di tutti i campioni sono state sottoposte a separazione elettroforetica su gel di agarosio'1%, contenente 0.5 µg/ml di bromuro di etidio, in TAE 1X (TAE 1 X = Tris-base 0.04 M, acido acetico glaciale 0.04 M, EDTA 0.01 M).

### ***Digestione dei campioni con DNasi***

I campioni di RNA totale sono stati digeriti con DNasi, al fine di rimuovere l'eventuale DNA contaminante presente nel campione.

Per ogni campione, la miscela di reazione è così composta:

- |                               |      |
|-------------------------------|------|
| - RNA                         | 5 µL |
| - 10X Buffer DNasi            | 1 µL |
| - DNasi I, RNasi free (1U/µL) | 1 µL |

---

- ddH<sub>2</sub>O 2 µL

I campioni vengono poi incubati in un *termociclatore Eppendorf 5345* a 37°C per 30 minuti. Successivamente è stato aggiunto ad ogni campione 1. µL di EDTA ed è stata eseguita un'ulteriore incubazione a 65°C per 10 minuti.

### ***Analisi mediante RT-PCR***

L'espressione genica del GHS-R1a è stata determinata utilizzando la tecnica della RT-PCR semiquantitativa. Dopo un primo passaggio in cui gli mRNA vengono retrotrascritti nei rispettivi cDNA complementari, si procede alla fase di amplificazione utilizzando primer specifici. I prodotti di amplificazione vengono poi separati mediante corsa elettroforetica su un gel di agarosio all'1% e l'intensità delle bande può essere determinata mediante analisi densitometrica.

I risultati ottenuti sono stati normalizzati utilizzando i valori ottenuti dall'analisi dell'mRNA per il GAPDH (gliceraldeide-6-fosfato deidrogenasi) dello stesso campione, un gene *house-keeping* costitutivo, la cui espressione non viene generalmente modificata dai trattamenti, ma varia soltanto in funzione della quantità di RNA totale.

### ***Retrotrascrizione (RT)***

Quattrocento ng di RNA totale di ogni campione sono stati retrotrascritti aggiungendo, in ogni tubo, un mix contenente 1 µl di oligo dT (500 µg/ml, Invitrogen), 0,4 µl di una miscela dei 4 dNTP (100 mM, Eppendorf), 200 U di trascrittasi inversa (MMLV Reverse Transcriptase, Invitrogen), 40 U di inibitore della Rnasi (Eppendorf), 4 µl di tampone di reazione 5X (Tris-HCL 20 mM, ph 8 a 25 °C, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, glicerolo 50%, Nonidet-P40 0,01%; Invitrogen), 2 µl di DTT alla concentrazione di 0.1 M (Invitrogen) e ddH<sub>2</sub>O sterile fino ad un volume finale di 20 µl.

I campioni sono stati incubati per 50 minuti a 37° C; la reazione di retrotrascrizione è stata inattivata mantenendo i campioni per 15 minuti a 70° C.

Al termine della reazione di retrotrascrizione, 2 µl di ogni campione sono stati successivamente utilizzati per la reazione di PCR, in cui sono stati usati oligonucleotidi specifici per i diversi fattori analizzati.

### ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Per l'amplificazione dei diversi geni analizzati sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi specifici, scelti sulla base della sequenza del gene, mediante i programmi *Primer 3* e *Oligo Explorer 1.2*:

- **GAPDH**

5'-GCCATCAACGACCCCTTCATTG-3' (senso)

5'-TCTGTCATGAGGTTGGCTTTCAG-3' (antisenso)

amplificano un frammento di 600 bp, con temperatura di annealing di 53° C;

- **GHS-R1a human**

5'-TCCAGCATCTTCTTCTTCCTTC-3' (senso)

5'-CACCCTACAGCCAGCATTTTC-3' (antisenso)

amplificano un frammento di 159 bp con temperatura di annealing di 54 °C;

- **GHS-R1a human (lunghe)**

5'-ATGTGGAACGCGACGCCC -3' (senso)

5'-TCATGTATTAATACTAGA -3' (antisenso)

amplificano un frammento di 1101 bp con temperatura di annealing di 47°C;

- **MURF-1 di ratto**

5'-GTCCCTACTTGCTCCTTGTG -3' (senso)

5'-TCCTCCTCCTCATCTGTCC -3' (antisenso)

amplificano un frammento di 578 bp con temperatura di annealing di 59°C;

A 2 µl della reazione di RT è stato aggiunto un mix contenente gli oligonucleotidi senso e antisenso del target da amplificare (concentrazione finale 0,45 µM), 1,25 U di TAQ Polimerasi (GO Taq DNA Polimerasi, Promega), 6 µl di Green Buffer 5X (pH 8,5, contenente MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM per una concentrazione finale di 1,5 mM), 0.3 dNTP (10mM, Invitrogen) ed infine ddH<sub>2</sub>O sterile, fino a raggiungere il volume finale di 30 µl.

Ogni reazione di PCR, che consiste in un processo di denaturazione (30 secondi a 94 °C), uno di annealing (30 o 45 secondi alla temperatura specifica per ogni

coppia di primer) e uno di elongazione della catena di DNA (30 o 60 secondi a 72 °C), è stata ripetuta per 35 cicli. I prodotti così ottenuti sono stati sottoposti a separazione elettroforetica su gel di agarosio 1%, contenente 0.5 mg/ml di bromuro di etidio, in TAE 1X. La densità delle bande è stata determinata esponendo il gel a un transilluminatore a raggi UV e mediante un sistema computerizzato di acquisizione e analisi dell'immagine che utilizza il *software Kodak 1D 3.5*.

### ***Retrotrascrizione con KIT Vilo per Real Time PCR***

400 ng di RNA totale sono stati sottoposti a retrotrascrizione mediante il kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen).

Per ogni campione, la mix di reazione è così composta:

- 5X VILO™ Reaction Mix                      4 µL
- 10X SuperScript® Enzyme Mix            2 µL
- RNA    4 µL
- ddH<sub>2</sub>O    10 µL

I campioni sono stati incubati nel termociclatore alle seguenti temperature:

<b>Temp</b>	<b>Time</b>
25°C	10 min
42°C	60 min
85°C	5 min

### ***Real-Time PCR***

I cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione vengono utilizzati per valutare i livelli di mRNA del TNF- $\alpha$ , MCP-1 e Lipina.

I campioni vengono diluiti 1:4 in modo da utilizzare 5ng di cDNA ed utilizzati in doppio. Si utilizza un saggio Taqman in un volume finale di 20 µL. Come gene housekeeping si è scelto il gene per la  $\beta$ -actina.

Per ogni campione, la mix di reazione è così composta:

- cDNA    4 µL
- Taqman® Universal PCR Master Mix    10 µL

- Taqman® Assay-On-Demand Gene Expression 1  $\mu$ L
- ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L

La Real-Time PCR è stata eseguita mediante lo strumento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) alle seguenti condizioni:

Stage	Temp	Time
Hold	50°C	2 min
Hold	95°C	10 min
40 cicli	95°C	15 sec
	60°C	1 min

I dati ottenuti vengono analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa del  $\Delta\Delta C_T$ . I valori di  $C_T$  sono stati ottenuti mediante il software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystem), utilizzando il valore di soglia calcolato manualmente (0.2). È stata eseguita un'analisi statistica tra i valori di fold change e sono stati considerati statisticamente significativi i valori di  $P < 0.05$ .

## ***ESPERIMENTI IN VIVO***

### ***ANIMALI***

Gli studi finalizzati ad ottenere un profilo endocrino delle molecole, sono stati effettuati nel ratto maschio neonato Sprague Dawley di 10 giorni di vita. (Charles River, Italia).

Gli esperimenti volti ad indagare l'effetto dei composti sulla cachessia da cisplatino sono stati condotti in ratti maschi di ceppo Wistar (Harlan, Udine, Italia) del peso di 200- 250 g stabulati singolarmente.

Gli esperimenti finalizzati ad ottenere un modello di obesità sono stati condotti in topi del ceppo C57BL/6J (Charles River, Calco, Italia) del peso di 20 g, 6 settimane di vita, stabulati quattro per gabbia. I topi sono stati alimentati con una dieta iperlipidica composta dal 65% di grassi (HFD). La dieta (24.1 MJ ME/kg) prodotta dalla "ssniff Spezialdiäten GmbH", è stata conservata a 4° C.

Sia i ratti che i topi hanno soggiornato nello stabulario per un periodo di adattamento di almeno una settimana prima dell'inizio dell'esperimento, in



condizioni standard di temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), umidità (65%) e illuminazione (luce artificiale dalle 8:00 alle 20:00).

Gli animali avevano a disposizione una dieta standard, o HFD e acqua *ad libitum*.

Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal Ministero Italiano della Salute ed eseguiti in accordo con la Direttiva europea 2010/63/EU.

### **ATTIVITA' GH SECERNENTE NEL RATTO NEONATO**

I ratti di 10 giorni di vita, a causa dell'immaturità del sistema somatostatinergico, rappresentano un modello sperimentale particolarmente adatto allo studio degli effetti dei GH-secretagoghi, per la loro forte responsività. Al decimo giorno di vita i ratti sono stati separati dalle rispettive nutrici, ridistribuiti in modo randomizzato e suddivisi in gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno; dopo trenta minuti, sono stati trattati con uno dei peptidi da testare (alla dose di  $160 \mu\text{g}/\text{kg}$ , s.c.,  $100 \mu\text{l}/\text{ratto}$ ). A distanza di 15 minuti dall'iniezione, gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti  $100 \mu\text{l}$  di EDTA 0.15 M e immediatamente centrifugati a 2500 rpm per 15 minuti a  $4^\circ\text{C}$ . Il plasma è stato congelato a  $-20^\circ\text{C}$  fino al dosaggio di GH mediante saggio di tipo EIA.

### **Dosaggio Immunoenzimatico GH (EIA)**

Il dosaggio è stato effettuato per mezzo di un kit commerciale fornito dalla ditta SPI-BIO (BERTIN Group, Montigny Le Bretonneux, France).

Il meccanismo del dosaggio si basa sulla competizione tra il GH contenuto nel campione da dosare e un tracciante costituito da GH di ratto marcato con acetilcolinaesterasi (AChE) per un numero limitato di siti di legame, specifici per un anticorpo anti-GH, ottenuto nella capra.

Il complesso *antisiero caprino-GH* (GH libero o tracciante) si lega successivamente ad un anticorpo policlonale di coniglio anti-immunoglobuline di capra che è adeso al fondo dei pozzetti della piastra.

La piastra viene quindi lavata e nei pozzetti viene aggiunto il reagente di Ellman (substrato enzimatico per AChE cromogeno). L'AChE reagisce con il reagente di Ellman formando un composto giallo.

L'intensità del colore, determinata attraverso spettrofotometria, è proporzionale alla quantità di tracciante legato ai pozzetti e inversamente proporzionale alla quantità di GH libero presente.

Il tempo totale richiesto per il completamento del test è di 3 giorni.

### **Metodologia**

#### **Primo giorno**

La piastra è stata inizialmente lavata cinque volte con 300 µl di *Wash Buffer*. Successivamente si aggiungono 5 µl di siero da testare e 45 µl di *EIA buffer* (in modo tale che il campione risulti essere diluito 1:10). La curva di taratura è stata costruita utilizzando 50 µl di GH standard di ratto a concentrazioni scalari: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 e 0.31 pg/ml in duplicato. Per controllare la performance del dosaggio sono stati utilizzati 50 µl di *Quality Control*, composto a contenuto noto di GH, i cui valori in ogni dosaggio devono rimanere entro determinati intervalli di riferimento. I bianchi sono stati ottenuti aggiungendo 100µl di *EIA Buffer* nei pozzetti del *Non-Specific Binding* (NSB, importanti per misurare il legame non specifico dell'ormone) e 50 µl in quelli di riferimento (Bo o bianchi). Infine sono stati aggiunti in tutti i pozzetti, eccetto che nei NSB, 50 µl di antisiero anti-GH di ratto; la piastra è stata coperta con una pellicola adesiva e lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 20 ore.

#### **Secondo giorno**

A tutti i pozzetti sono stati aggiunti 50 µl di *Rat GH AChE tracer*, la piastra è stata ricoperta con la pellicola adesiva e lasciata incubare per altre 20 ore sempre a temperatura ambiente.

#### **Terzo giorno**

Trascorso il tempo di incubazione, i pozzetti sono stati svuotati per inversione; la piastra è stata successivamente lavata 5 volte con 300 µl/pozzetto di *Wash Buffer*. Sono stati quindi aggiunti a ciascun pozzetto 200 µl di *Ellman's Reagent*; dopo un'incubazione della durata di 1 ora e 45 minuti a temperatura ambiente, in assenza di luce, e dopo aver verificato che i valori di Bo avessero raggiunto valori di assorbanza compresi tra le 0.2-0.8 unità, è stata eseguita la lettura a 405 nm.

### ***ESPERIMENTI DI FOOD-INTAKE SU RATTI CACHETTICI***

Gli animali sono stati stabulati singolarmente in gabbie dalle dimensioni di 30 x 30 x 30 cm e maneggiati per alcuni giorni prima dell'inizio degli esperimenti, per mimare le condizioni sperimentali e ridurre lo stress da manipolazione.

Nella prima parte degli esperimenti, dopo aver tolto il cibo dalla gabbia gli animali sono stati trattati due volte al giorno, al mattino (8.30 a.m) e al pomeriggio (5 p.m) per 11 giorni con hexarelin e i JMV (i.p., 320 µg/kg, 200 µl/100g di peso corporeo). Il CDDP è invece somministrato, mediante una seconda iniezione, al mattino (9:00 a.m.) per i primi tre giorni di trattamento (i.p., 1 mg/kg, 600 µl/100g di peso corporeo).

Durante i trattamenti è stata valutata l'assunzione di cibo, a due ore dall'ultima somministrazione, il 4°, 9° e 12° giorno.

Alla fine degli esperimenti gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati i depositi adiposi di grasso perirenale, epididimale, sottocutaneo e il muscolo.

### ***ESPERIMENTI SU TOPI OBESI***

Gli animali sono stati stabulati a gruppi di 4 animali per gabbia e maneggiati per alcuni giorni prima dell'inizio degli esperimenti, per mimare le condizioni sperimentali e ridurre lo stress da manipolazione.

Un gruppo di animali sono stati alimentati con dieta standard e altri con dieta HFD per 9 settimane. Al raggiungimento dello stato di obesità è iniziato il trattamento con EP 80317 e JMV 2959, che sono stati somministrati per via intraperitoneale (i.p.) due volte al giorno (8.30 a.m) e al pomeriggio (5 p.m) alla dose di 320 µg/Kg per 7 giorni.

Durante tutto il periodo sperimentale sono stati monitorati quotidianamente il peso corporeo e il consumo giornaliero di cibo. Al termine dopo un digiuno di 12 h gli animali sono stati eutanatizzati e il sangue è stato prelevato per determinare i livelli di glicemia e di diversi ormoni circolanti.

### **DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO (EIA)**

La determinazione dei differenti analiti rilasciati dal tessuto adiposo, adipochine, e citochine circolanti è stata effettuata con il dosaggio immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) utilizzando differenti kit commerciali.

Il metodo viene denominato ELISA sandwich in quanto utilizza una procedura in cui l'antigene viene intrappolato tra due strati di anticorpi. Il kit contiene una piastra per microtitolazione i cui pozzetti sono stati preparati con un anticorpo monoclonale anti-analita. Le soluzioni standard, i controlli e i campioni vengono aggiunti nei pozzetti seguendo il protocollo. L'anticorpo monoclonale adeso alle pareti dei pozzetti lega l'analita presente nei campioni e negli standard. Dopo una serie di lavaggi, viene aggiunto in ogni pozzetto un anticorpo policlonale specifico per l'analita coniugato con perossidasi di rafano (HRP). Dopo aver eseguito alcuni lavaggi per eliminare l'anticorpo non legato, viene aggiunto il substrato cromogenico della HRP; la reazione genera un prodotto blu che, in seguito all'aggiunta di una soluzione di stop, diventa giallo. L'intensità della colorazione, misurabile spettrofotometricamente, è direttamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione.

A questo punto la piastra è posta nello spettrofotometro multifunzione *VICTOR<sup>3</sup>* (*Perkin Elmer*) e si effettua la lettura alla lunghezza prestabilita dal kit.

Mettendo in relazione i valori di assorbanza dei pozzetti contenenti quantità note di analita con la concentrazione espressa è possibile costruire una retta di taratura; in seguito, conoscendo le assorbanze dei campioni, è possibile estrapolare dalla retta di taratura le concentrazioni di analita.

Mediante questi dosaggi abbiamo quantificato i valori di ghrelin, PYY, GLP-1.

### **TECNOLOGIA LUMINEX**

Mediante la tecnologia luminex è possibile analizzare simultaneamente fino a 100 differenti biomolecole in un piccolo volume di campioni biologici.

Il saggio può essere eseguito su sovranatanti (da 12 a 50  $\mu$ l) di colture cellulari e tessutali, plasma, siero, fluido di lavaggio bronco-alveolare, fluido cerebrospinale, fluido peritoneale e fluido sinoviale.

Questo saggio si basa sull'utilizzo di microsfere di polistirene (del diametro di 5.6  $\mu\text{m}$ ) a cui viene legato un anticorpo specifico per l'analita che si vuole quantificare. Queste microsfere sono coniugate a due fluorocromi in concentrazioni diverse tali da determinare fino a 100 diverse regioni.

Quindi ogni diversa microsfera, determinata da un'unica regione, sarà legata ad un anticorpo per un diverso analita e questo permetterà la rilevazione di più analiti, fino a 100 in uno stesso campione.

L'esecuzione del saggio prevede:

- aggiunta di una combinazione delle diverse microsfere nei pozzetti di una apposita piastra per il saggio e lavaggi con una soluzione tampone; la piastra usata è costituita da pozzetti con fondi a filtri che consentono il lavaggio tramite aspirazione della soluzione tampone dal basso, in modo che le microsfere non vengano disperse;
- aggiunta dei campioni contenenti gli analiti da misurare e lavaggi con la soluzione tampone;
- aggiunta di un anticorpo secondario coniugato a biotina; questo anticorpo lega l'analita in un sito diverso rispetto all'anticorpo legato alla microsfera, e relativi lavaggi;
- aggiunta di streptavidina coniugata ad un terzo fluoroforo e relativi lavaggi;
- risospensione delle microsfere in un tampone di lettura.

Lo strumento sfrutta lo stesso principio del citofluorimetro per rilevare reazioni che avvengono sulla superficie di microsfere fluorescenti. Le microsfere vengono aspirate da un ago e portate nella camera di lettura dove vengono fatte passare una ad una e colpite da due laser. Uno riconosce la regione della microsfera, e quindi il relativo analita riconosciuto dall'anticorpo a lei legato, andando ad eccitare i due fluorocromi che la determinano, mentre l'altro laser la quantifica perché eccita il fluoroforo legato sull'anticorpo secondario.

Mediante questa tecnologia abbiamo dosato tre differenti adipochine: insulina, leptina, resitina.

### **SKYSCAN 1176**

Lo *Skyscan 1176* è uno scanner utilizzato nella ricerca preclinica che consente un'analisi microtomografica computerizzata di alta qualità. La camera a raggi X di 11 megapixel fornisce un'ottima risoluzione dell'immagine con un'alta velocità di scansione. Il campo dell'immagine ampio fino a 68 mm permette la scannerizzazione completa del corpo di topo e/o ratto a differenti dimensioni di pixel 9, 18 e 35  $\mu\text{m}$ . Una telecamera interna al sistema permette un monitoraggio continuativo del respiro dell'animale durante tutta la scannerizzazione. Con questo strumento abbiamo analizzato la quantità di tessuto adiposo presente nei topi sottoposti ai differenti trattamenti.

### **ANALISI STATISTICA**

I risultati di tutti gli esperimenti sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media ( $M \pm \text{SEM}$ ). La significatività statistica delle differenze tra i diversi gruppi di trattamento è stata valutata con il test di Dunnett, preceduto dall'analisi della varianza a una via (*one way ANOVA*). Sono state considerate significative le differenze con valore di  $p < 0.05$ .

## ***Risultati***

## **MOBILIZZAZIONE DEL CALCIO INTRACELLULARE**

È stato dimostrato che il GHS-R1a attiva la via di trasduzione della fosfolipasi C, che induce rilascio di calcio dai depositi intracellulari e produzione di diacilglicerolo. Il saggio fluorimetrico di mobilizzazione del calcio intracellulare è stato quindi utilizzato per testare l'attività biologica *in vitro* dei composti in esame. Abbiamo condotto esperimenti preliminari su cellule CHO per verificare la loro responsività al sistema. L'iniezione del solvente nel quale sono stati risospesi i composti, l'HBSS, non ha provocato variazioni nella fluorescenza basale; analoga risposta si è ottenuta con l'iniezione di ghrelin  $10^{-6}$  M. La funzionalità del sistema è stata verificata utilizzando ATP 50  $\mu$ M, uno stimolo noto in letteratura per la sua capacità di indurre la mobilizzazione del calcio intracellulare in seguito al legame con i propri recettori costitutivamente espressi nelle cellule CHO (**Figura 1**).

Verificato che le CHO non rispondono allo stimolo con ghrelin, si è deciso di utilizzarle per esprimere stabilmente il GHS-R1a. L'espressione del recettore nel clone selezionato, denominato CHO162A12, è stata verificata mediante analisi RT-PCR. La presenza della banda specifica sia a 159 bp (**Figura 2A**) sia a 1101 bp (**Figura 2B**) ha confermato l'esito positivo della transfezione.

La funzionalità del recettore è stata verificata con il saggio di mobilizzazione del calcio intracellulare stimolata con ghrelin, il ligando endogeno del GHS-R1a, alla concentrazione di  $10^{-8}$  M e  $10^{-6}$  M; entrambe le concentrazioni hanno attivato il recettore, provocando un aumento della fluorescenza, e come atteso l'effetto è risultato maggiore per la concentrazione di  $10^{-6}$  M (**Figura 3**).

La risposta a ghrelin è immediata e inizia a decrescere circa 10 secondi dopo la stimolazione. La lettura è stata condotta per 20 secondi prima dello stimolo e 60 dopo. La fluorescenza basale del sistema è stata determinata con l'iniezione del solo HBSS, mentre l'iniezione di ATP 50  $\mu$ M ha confermato la funzionalità del sistema; queste operazioni sono state condotte in ogni successivo saggio.

Anche hexarelin, un GHS sintetico peptidico la cui capacità di stimolare la secrezione di GH e l'appetito è stata ben caratterizzata nel nostro laboratorio, si è dimostrata efficace nello stimolare in modo dose-dipendente il GHS-R1a espresso dal clone e con intensità paragonabile a quella di ghrelin (**Figura 4**).

Hexarelin alla concentrazione  $10^{-6}$  M è stata quindi utilizzata come composto di riferimento nei successivi esperimenti.



Abbiamo inoltre analizzato la risposta del clone CHO162A12 al composto D-Lys-GHRP6, un noto antagonista del GHS-R1a. Come atteso, l'iniezione dell'antagonista nei pozzetti contenenti le cellule non induce mobilizzazione del calcio intracellulare. Inoltre, D-Lys-GHRP6 alla concentrazione  $10^{-8}$  M e  $10^{-6}$  M è in grado di inibire il rilascio di calcio dai depositi intracellulari indotto da hexarelin (**Figura 5**).

Il sistema costituito dal clone CHO162A12 è quindi idoneo per indagare lo stato di attivazione e la funzionalità *in vitro* del GHS-R1a poiché è in grado di rispondere in modo specifico a agonisti e antagonisti del recettore in esame.

Di seguito sono riportati i risultati di esperimenti che hanno permesso di classificare i composti in studio come agonisti o antagonisti del GHS-R1a.

## ***Agonisti***

I composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2986, JMV 2894 sono stati utilizzati alla concentrazione  $10^{-6}$  M.

Per le letture è stata utilizzata la coppia di filtri eccitazione/emissione 485/535 nm.

I risultati sono stati espressi o come UFR (unità di fluorescenza relativa) o come differenza di AUC (*area under the curve*) registrata prima e dopo l'iniezione degli stimoli.

JMV 2951, JMV 2952 e JMV 2894 hanno stimolato efficacemente e significativamente la mobilizzazione del calcio intracellulare. L'effetto dei tre composti in esame è risultato sovrapponibile a quello di hexarelin alla stessa concentrazione. Solo JMV 2986 ha determinato una mobilizzazione del calcio intracellulare inferiore a quella di hexarelin e di JMV 2951, JMV 2952 e JMV 2894 (**Figura 6**).

---

## ***Antagonisti***

JMV 3002, JMV 3012 e JMV 2959 sono stati utilizzati, come precedentemente hexarelin, alla concentrazione  $10^{-6}$  M.

Per le letture è stata utilizzata la coppia di filtri eccitazione/emissione 485/535 nm.

I risultati sono stati espressi o come UFR (unità di fluorescenza relativa) o come differenza di AUC (*area under the curve*) registrata prima e dopo l'iniezione degli stimoli.

JMV 2959 e JMV 3012 non stimolano la mobilizzazione del calcio intracellulare (**Figura 7**). Per contro, JMV 3002 ha indotto un moderato ma significativo aumento del calcio libero intracellulare.

I composti antagonisti sono stati somministrati anche con hexarelin per verificare se inibivano l'effetto indotto da hexarelin. Gli antagonisti JMV 3002, JMV 3012 e JMV 2959 non provocano rilascio di calcio dai depositi intracellulari e inibiscono la risposta indotta da hexarelin (**Figura 8**).

### **LOCALIZZAZIONE DEL GHS-R1 $\alpha$**

Utilizzando il microscopio confocale abbiamo studiato la cinetica del GHS-R1 $\alpha$  prima e dopo la stimolazione con hexarelin. Il sistema è stato messo a punto per poter in futuro verificare la capacità dei diversi agonisti e antagonisti di indurre internalizzazione del GHS-R1 $\alpha$ .

A questo scopo abbiamo transfettato le cellule CHO con un plasmide in cui il GHS-R1 $\alpha$  è coniugato con la *green fluorescent protein* (GFP). In condizioni di riposo il GHS-R1 $\alpha$  è prevalentemente localizzato sulla membrana citoplasmatica (**Figura 9A**). Dopo 40 minuti di stimolazione con hexarelin  $10^{-6}$  M è possibile osservare che la maggior parte del GHS-R1 $\alpha$  è localizzata nel citoplasma (**Figura 9B**) a indicare una massiva internalizzazione del recettore.

## **STUDIO DEGLI EFFETTI ENDOCRINI DEI GHS**

### **Effetti sulla secrezione di GH**

La dose di 80 µg/kg di hexarelin utilizzata nei nostri esperimenti precedenti come termine di confronto per analizzare le proprietà GH rilascianti dei nuovi composti peptidomimetici, è stata scelta sulla base di esperimenti di dose-effetto condotti nel ratto neonato, che avevano permesso di dimostrare come questa fosse la dose minima capace di stimolare in modo massimale la secrezione di GH. Pertanto, come atteso, la somministrazione di hexarelin, alla dose di 80 µg/Kg, ha stimolato in modo significativo il rilascio di GH rispetto agli animali di controllo trattati con il solo solvente (GH plasmatico:  $180.4 \pm 27.5$  ng/ml vs  $11.13 \pm 1.98$  ng/ml,  $p < 0.001$ , rispettivamente per hexarelin vs soluzione fisiologica).

Analogamente ad hexarelin, anche tutti i composti esaminati, ad eccezione di JMV 2903 (**Figura 10**), hanno stimolato significativamente la secrezione di GH.

In particolare, i composti JMV 2951 e JMV 2986, pur non attivi alla dose inferiore (20 µg/Kg), mostravano un'efficacia sovrapponibile a quella di hexarelin quando somministrati in dose di 80 µg/Kg (GH plasmatico:  $174.09 \pm 13.30$  ng/ml e  $231.36 \pm 30.43$  ng/ml vs  $180.4 \pm 27.5$  ng/ml, rispettivamente UMB 2951 e UMB 2986, vs hexarelin). La dose di 80 µg/Kg induceva un effetto già massimale (**Figura 11**).

La dipendenza dose-effetto era tuttavia differente per gli altri composti in esame. Il composto JMV 2952, infatti, non era attivo nell'ambito inferiore delle dosi, ma solo alla dose più elevata (320 µg/Kg) era in grado di eguagliare l'effetto di hexarelin (**Figura 11**). Al contrario, il composto JMV 2894 era attivo alle dosi di 80 e 320 µg/Kg, ma non a quelle di 20 e 160 µg/Kg (**Figura 12**).

---

**STUDIO DEGLI EFFETTI EXTRAENDOCRINI DEI GHS****Effetti sul comportamento alimentare****Food intake acuto nel ratto giovane-adulto**

La capacità dei composti peptidomimetici di stimolare acutamente l'assunzione di cibo è stata confrontata con quella di hexarelin, la cui attività orezzizzante era stata ampiamente studiata in esperimenti precedenti che hanno consentito di stabilirne il rapporto dose-effetto. I nuovi GHS ed hexarelin sono stati somministrati al mattino per via i.p., alla dose di 160 µg/Kg, nel ratto maschio giovane-adulto, mantenuto in regime di libero accesso a cibo ed acqua. Nei nostri esperimenti il consumo di cibo è stato valutato ogni ora per sei ore dalla somministrazione dei composti in esame.

Come atteso, la somministrazione di hexarelin ha stimolato rapidamente l'assunzione di cibo con un effetto a rapida insorgenza e che si esauriva entro due ore dall'iniezione (grammi di cibo consumato/100 grammi di peso corporeo:  $0.97 \pm 0.13$  e vs  $0.08 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$  hexarelin vs soluzione fisiologica).

Un effetto simile, anche se meno accentuato quantitativamente, era osservabile anche negli animali trattati con i composti JMV 2951 e JMV 2952 (grammi di cibo consumato/100 grammi di peso corporeo:  $0.65 \pm 0.11$  e  $0.46 \pm 0.11$  vs  $0.08 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ , rispettivamente JMV 2951 e JMV 2952 vs soluzione fisiologica), mentre il trattamento con JMV 2903, JMV 2894 e JMV 2986 non modificava il consumo di cibo, rispetto agli animali di controllo (**Figura 13**).

L'effetto sull'assunzione di cibo era limitato alle prime due ore dopo la stimolazione e, in genere, non si modificava a sei ore dal trattamento (**Figura 13**).

---

### ***Effetto della somministrazione per 5 o 11 giorni di farmaci peptidici sull'assunzione di cibo e sul peso corporeo nel modello di cachessia da cisplatino***

In questi esperimenti è stato valutato l'effetto della somministrazione cronica, per 5 o per 11 giorni, di ghrelin, hexarelin e dei diversi GHS in studio, in un modello animale di cachessia indotta da cisplatino (CDDP), sull'andamento del peso corporeo e sull'assunzione di cibo.

Per riprodurre un modello molto più simile alla condizione umana, abbiamo utilizzato un trattamento con CDDP con effetti paragonabili a quelli della terapia antitumorale nell'uomo. Il CDDP è stato somministrato, quotidianamente, per 3 giorni consecutivi, in dose di 1 mg/kg i.p. (600 µl/100 g di peso corporeo), mentre i GHS in esame venivano somministrati trenta minuti prima del CDDP.

#### ***Trattamento di 5 giorni con GHS***

La somministrazione di CDDP (1 mg/Kg, i.p.), una volta al giorno, per i primi tre giorni di trattamento, causava una riduzione significativa del peso corporeo dei ratti. L'effetto massimo era evidenziabile dopo quattro giorni dall'inizio del trattamento ( $8.1 \pm 1.3$  % di decremento di peso corporeo, per CDDP vs soluzione fisiologica,  $p < 0.001$ ). Tuttavia, gli animali trattati sia con CDDP che con hexarelin (160 µg/Kg, i.p., bid) o con i composti JMV 2894 e JMV 2952 (320 µg/Kg, i.p., bid) al quinto giorno mostravano un recupero parziale di peso, anche se non statisticamente significativo ( $3.14 \pm 0.83$  %,  $4.55 \pm 1.12$  % e  $4.04 \pm 1.30$  % di recupero di peso corporeo, rispettivamente per hexarelin +CDDP, JMV 2894 + CDDP e JMV 2952 + CDDP vs CDDP), mentre i ratti che avevano ricevuto CDDP e i composti JMV 2903, JMV 2986 e JMV 2951 non mostravano segni di recupero e mantenevano un peso sovrapponibile a quello degli animali trattati soltanto con CDDP (**Figura 14**). Nonostante la mancanza di efficacia sul ripristino del peso corporeo, tutti i composti, ad eccezione di JMV 2903, mantenevano la capacità di stimolare acutamente, in modo efficace, l'assunzione di cibo anche al quinto giorno di trattamento (**Figura 15**).

---

**Trattamento di 11 giorni con GHS**

Poiché negli esperimenti iniziali con alcuni GHS abbiamo potuto evidenziare un parziale effetto positivo sul recupero del peso corporeo solo dopo cinque giorni di trattamento, negli esperimenti successivi abbiamo sottoposto i ratti ad un trattamento con GHS più prolungato di 11 giorni.

Nonostante una ripresa parziale, a partire dal quinto giorno, l'effetto negativo sull'andamento del peso corporeo prodotto dalla somministrazione del CDDP, si manteneva per tutta la durata del trattamento ( $7.13 \pm 0.55\%$  di decremento di peso corporeo, per CDDP vs soluzione fisiologica,  $p < 0.001$ ). In questo caso, tuttavia, il prolungamento a 11 giorni del trattamento con hexarelin o con JMV 2894, ma non con gli altri composti, era in grado di produrre un significativo recupero del peso degli animali rispetto al trattamento con soluzione fisiologica nei ratti trattati con CDDP ( $2.9 \pm 0.85\%$  e  $4.95 \pm 1.71\%$  di recupero di peso corporeo, rispettivamente hexarelin + CDDP e JMV 2894 + CDDP vs CDDP  $p < 0.05$ ) (**Figura 16**).

La valutazione della quantità totale di cibo consumata dagli animali indica chiaramente che tale effetto positivo sul recupero del peso corporeo non è imputabile all'effetto oressizzante dei composti, in quanto il consumo totale di cibo dei ratti trattati con CDDP e GHS non differiva significativamente da quello dei ratti trattati con CDDP e soluzione fisiologica (**Figura 17**).



***Effetti del trattamento cronico con GHS sulla massa dei depositi di tessuto adiposo***

I risultati ottenuti nei nostri esperimenti hanno dimostrato che il trattamento con CDDP (1 mg/Kg, i.p., per i primi tre giorni di trattamento) non modificava significativamente, dopo 11 giorni, la massa dei depositi adiposi perirenale, epididimale e sottocutaneo, rispetto agli animali di controllo (**Figura 18**).

Inoltre, neppure la somministrazione per 11 giorni di hexarelin o dei composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 2986 e JMV 2903 è stata in grado di modificare il peso di tali depositi (**Figura 18**).

---

***Effetti del trattamento cronico con GHS sull'espressione genica di MuRF-1 nel muscolo***

Il livelli di mRNA per MuRF-1, un enzima del sistema ubiquitina-proteosoma implicato nella degradazione proteica muscolare, nel muscolo degli animali trattati con CDDP (1 mg/kg, i.p., per i primi tre giorni di trattamento) erano simili a quelli degli animali di controllo. Tuttavia, il trattamento per 11 giorni con i GHS tendeva a diminuire i livelli di mRNA per MuRF-1, suggerendo un'azione anticatabolica. In particolare tale riduzione risultava significativa negli animali trattati con CDDP e JMV 2894 rispetto agli animali che avevano ricevuto solamente CDDP (26% di decremento, rispettivamente CDDP +JMV 2894 vs CDDP+SAL,  $p<0.05$ ) (**Figura 19**).

***Effetto della somministrazione per 9 settimane di dieta ad alto contenuto di grassi per indurre il modello di obesità***

L'obesità è stata indotta in topi C57BL/6J (6 settimane di vita; peso corporeo di 20g circa) mediante la somministrazione di una dieta iperlipidica composta dal 65% di grassi (HFD) per 9 settimane.

I topi nutriti con dieta HFD hanno evidenziato un aumento significativo del peso corporeo. Il peso degli animali è raddoppiato rispetto a quello dei topi dello stesso ceppo alimentati con dieta standard (**Figura 20**).

Il valore di *Body Mass Index* (BMI), di  $0.33 \pm 0.02$  all'inizio dell'esperimento, ha raggiunto un valore di  $0.40 \pm 0.01$  al termine delle 9 settimane di osservazione.

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sul peso corporeo nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Al raggiungimento dello stato di obesità è iniziato il trattamento con i due antagonisti, EP 80317 (caratterizzato in esperimenti precedenti nel nostro laboratorio)(*Petterson et al 2002*) e JMV 2959, somministrati per via intraperitoneale (i.p.) due volte al giorno alla dose di 320 µg/Kg per 7 giorni.

Durante tutto il periodo sperimentale sono stati monitorati giornalmente il peso corporeo e il consumo giornaliero di cibo.

Il trattamento con EP 80317 ha indotto una riduzione del peso corporeo significativa del 3.2% ±0.6 (**Figura 21**).

### ***Analisi microtomografica computerizzata***

Le analisi microtomografiche con Skyscan 1176 sui topi dei gruppi sperimentali (controlli, obesi, JMV 2959 ed EP 80317) hanno permesso di dimostrare che la riduzione dell'aumento del peso corporeo ben correlava con una minore deposizione di tessuto adiposo (**Figura 22**).

E' inoltre stato possibile quantificare la distribuzione percentuale del grasso corporeo suddividendolo ulteriormente in grasso sottocutaneo e grasso intorno agli organi.

Come atteso la quantità di grasso corporeo è maggiore nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e risulta diminuita in seguito al trattamento con il composto EP 80317. La quantità di grasso sottocutaneo e quella di grasso intorno agli organi non differiscono tra gli animali sottoposti ai differenti trattamenti (**Figura 23**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori di glicemia nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Al termine dei trattamenti gli animali sono stati decapitati dopo un digiuno di 12 h e il sangue è stato prelevato per determinare i livelli di glicemia.

Nei topi obesi il valore della glicemia (140 mg/dl) era significativamente superiore ( $P < 0.05$ ) rispetto a quello dei controlli (60 mg/dl). Il trattamento con EP 80317 e JMV 2959 non alterava i valori di glicemia (**Figura 24**).

---

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori di glucagon-like peptide-1 (GLP-1) nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerata la correlazione tra obesità e insorgenza di diabete abbiamo misurato le variazioni dei livelli plasmatici dalle incretine. Esse sono fattori endocrini rilasciati dall'intestino in risposta all'assunzione di nutrienti, in particolare carboidrati, aumentando la secrezione di insulina e inibendo il rilascio di glucagone in modo glucosio dipendente; gli effetti insulintropici si sono manifestati solo in presenza di valori glicemici > 90 mg/dl.

Abbiamo quindi determinato i livelli di *glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Essi sono più elevati negli animali obesi (2.55 ng/ml) rispetto ai controlli (1.04 ng/ml) e il trattamento con EP 80317 e JMV 2959 non modifica in modo significativo i valori di GLP-1 (**Figura 25**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori di ghrelin nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerato il ruolo svolto da ghrelin sull'assunzione di cibo abbiamo misurato i valori dei livelli plasmatici dell'ormone in topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso i livelli plasmatici di gherlin risultano significativamente diminuiti nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi.

Il trattamento con EP 80317 e JMV 2959 non modifica in modo significativo i valori di ghrelin (**Figura 26**).



---

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori di alcune adipochine nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerando il ruolo sempre più rilevante del tessuto adiposo nella sindrome metabolica, e la progressiva scoperta di numerose proteine di natura adipocitaria denominate “adipochine”, abbiamo effettuato dosaggi dei livelli plasmatici di diversi ormoni di questa famiglia.

Le adipochine esercitano un ruolo di primo piano nella regolazione della massa grassa influenzando il bilancio energetico, il metabolismo e la sensibilità all'insulina attraverso sia meccanismi di tipo endocrino/paracrino, sia mediante processi di angiogenesi, e di variazione delle dimensioni e del numero degli adipociti.

Mediante la tecnologia luminex abbiamo dosato i valori di insulina, leptina e resistina.

Nei topi obesi i livelli di leptina sono significativamente più elevati (3905.8 pg/ml) rispetto ai controlli (475.71 pg/ml) e il trattamento con JMV 2959 aumenta in modo significativo i livelli di leptina rispetto agli animali obesi (8921.5 pg/ml;  $p < 0.05$ ) (**Figura 27**).

I livelli di insulina circolante sono risultati simili tra i differenti gruppi di trattamento e indipendenti dalla dieta, anche se il trattamento con JMV 2959 induceva una tendenza all'aumento dei livelli di insulina (**Figura 28**).

Il livello di resistina nei topi obesi è più elevato rispetto ai controlli e il trattamento con JMV 2959 aumenta ulteriormente tale valore anche se non raggiunge significatività statistica (**Figura 29**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori dei trigliceridi nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerata la ben nota tendenza della dieta ad alto contenuto di grassi ad indurre un aumento dei valori plasmatici di trigliceridi, abbiamo misurato i valori dei trigliceridi mediante saggio colorimetrico per verificare eventuali effetti dei trattamenti farmacologici su questo parametro.

Come atteso i livelli dei trigliceridi sono aumentati nei topi obesi alimentati con dieta ad alto contenuto di grasso sebbene tale aumento non sia risultato statisticamente significativo. In seguito al trattamento con JMV 2959 e EP 80317 i valori dei trigliceridi non risultano modificati (**Figura 30**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori dei PYY nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Il PYY, un ormone prodotto da cellule endocrine specializzate nell'intestino e liberato in seguito all'ingestione di cibo, è un fattore che inibisce l'assunzione del cibo. Anche se attualmente mancano ancora dati definitivi, si pensa che il PYY agisca a livello cerebrale sui recettori Y2 influenzando il senso di sazietà.

Abbiamo misurato i livelli circolanti di tale ormone e i risultati da noi ottenuti dimostrano che i trattamenti non inducono differenze significative nei differenti gruppi di animali (**Figura 31**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori del TNF- $\alpha$  nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerato il ruolo dell'infiammazione in seguito all'insorgenza di obesità, abbiamo misurato mediante real-time PCR i livelli di mRNA del TNF- $\alpha$  nei depositi di grasso epididimale di topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso i livelli di mRNA di TNF- $\alpha$  risultano aumentati nei depositi adiposi epididimali dei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi ( $P < 0.05$ ).

Il trattamento JMV 2959 e con EP 80317 tende a ridurre, anche se in modo non significativo, l'aumento dei livelli di mRNA di TNF- $\alpha$  (**Figura 32**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori di MCP-1 nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerando il ruolo dell'infiammazione nell'obesità, abbiamo misurato mediante real-time PCR anche i livelli di mRNA di MCP-1 nei depositi di grasso epididimale in topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso i livelli plasmatici di MCP-1 risultano aumentati nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi ( $P < 0.05$ ).

Il trattamento con JMV 2959 e con EP 80317 tende a far diminuire, anche se in modo non significativo, i livelli di mRNA di MCP-1 (**Figura 33**).

***Effetto della somministrazione per 7 giorni di composti antagonisti sui valori della lipina nel modello di obesità indotta da dieta iperlipidica***

Considerato il ruolo della lipina, necessaria per la corretta differenziazione adipocitaria, abbiamo misurato mediante real-time PCR i livelli di lipina nel tessuto adiposo epididimale di topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso i livelli di mRNA della lipina risultano diminuiti nel grasso epididimale dei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi ( $P < 0.05$ ).

Il trattamento JMV 2959 tende a indurre un aumento, anche se non significativo, dei livelli di mRNA della lipina (**Figura 34**).

## ***Discussione***

L'obesità è divenuta con il passare degli anni una patologia con diffusione pandemica che provoca importanti problemi sanitari, sociali e di incremento della mortalità. Il numero di persone affette da obesità è ormai allarmante sul fronte opposto, la cachessia è un problema sanitario di notevole importanza che si presenta spesso in associazione ad altre patologie molto diffuse.

Non essendo disponibili ad oggi terapie efficaci contro tali patologie, la scoperta di ghrelin ha aperto la possibilità di ricercare nuovi farmaci in grado di modulare l'assunzione di cibo. In questo contesto abbiamo progettato e sintetizzato nuovi composti peptidomimetici, analoghi di ghrelin, dotati di attività agonista o antagonista sul GHS-R1a in collaborazione con *l'Istitut des Biomolécules Max Mousseron* dell'Università di Montpellier, Francia.

Inizialmente abbiamo caratterizzato le nuove molecole per studiarne l'attività sul GHS-R1a utilizzando la misurazione della mobilizzazione del calcio intracellulare. Il metodo che abbiamo impiegato si è rivelato un buon modello in vitro per predire l'attività dei composti in esame sul comportamento alimentare.

I nostri risultati hanno evidenziato come alcuni dei nuovi ligandi peptido-mimetici del GHS-R1a possano essere efficaci nell'aumentare (agonisti) o nel ridurre (antagonisti) l'assunzione di cibo, suggerendo un loro possibile sviluppo come farmaci per il trattamento rispettivamente della cachessia e dell'obesità.

Ghrelin è stata inizialmente identificata come ligando endogeno del GHS-R1a, espresso, oltre che nello stomaco, anche nell'ipofisi e nelle aree cerebrali ipotalamiche maggiormente coinvolte nella regolazione dell'assunzione di cibo (ARC, PVN e LHA). I nostri esperimenti hanno confermato la capacità di ghrelin di attivare il GHS-R1a ed evidenziato il suo coinvolgimento nei meccanismi che regolano l'assunzione di cibo. Analogo comportamento è stato evidenziato anche con l'agonista sintetico del GHS-R1a, hexarelin.

I livelli plasmatici di ghrelin nell'uomo sono elevati durante il digiuno, con un picco che precede l'inizio del pasto, e un declino dei livelli plasmatici che segue l'introduzione di alimenti (*Tschop 2001*). I livelli plasmatici di ghrelin sono inoltre negativamente correlati con l'entità del BMI: sono elevati in soggetti con anoressia nervosa e cachessia e ridotti nei soggetti obesi (*Purnell, Cummings et al. 2007*). Questi risultati hanno portato a concludere che ghrelin è il principale segnale ormonale periferico coinvolto nella stimolazione dell'inizio del pasto (*Cummings, Purnell et al. 2001*).



Le proprietà di ghrelin, come detto precedentemente, sono condivise anche da numerosi GHS, un gruppo di molecole sintetiche peptidiche e non peptidiche, che negli ultimi due decenni hanno destato particolare interesse in ambito endocrinologico. Infatti, in virtù delle loro proprietà GH stimolanti, costituiscono una classe di composti potenzialmente utili dal punto di vista terapeutico per il trattamento di condizioni caratterizzate da deficit della secrezione di GH, non solo per il minor costo rispetto alla terapia sostitutiva con GH ricombinante, ma anche per gli indiscutibili vantaggi di essere attivi per via orale e di mantenere attivi i sistemi di controllo a feedback della secrezione somatotropa, impedendo la comparsa in circolo di quantità eccessive di ormone che può essere fonte di effetti indesiderati (*Lengyel 2006*).

Uno scopo di questa ricerca è stato quello di studiare l'effetto di un trattamento prolungato con nuovi GHS sintetici, in particolare alcuni nuovi agonisti del recettore di gherlin (JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 2986 e JMV 2903) in un modello animale di cachessia indotta dalla somministrazione di cisplatino e degli antagonisti JMV 2959 e EP 80317 in un modello di obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

Il cisplatino è un agente chemioterapico ancora oggi molto usato per il trattamento di alcune forme tumorali, tra le quali quelle di testicolo, vescica, polmone, esofago, stomaco e ovaio. Tuttavia, come per altri farmaci antitumorali, il suo utilizzo spesso si accompagna all'insorgenza di gravi effetti collaterali come cachessia, nausea e perdita di appetito. Tali complicanze, oltre ad aggravare la qualità di vita dei pazienti affetti da neoplasia, spesso limitano la capacità del paziente di affrontare la chemioterapia stessa. Il meccanismo fisiopatologico che determina lo stato di cachessia, caratterizzato da perdita di peso, anoressia, astenia, perdita di massa muscolare, deplezione dei depositi adiposi e aumento del dispendio energetico, è ancora sconosciuto e attualmente non esistono terapie farmacologiche in grado di contrastare il deperimento organico che ne consegue. Pertanto, la necessità di trovare nuovi agenti farmacologici efficaci nei confronti di tale condizione rappresenta un importante obiettivo terapeutico. Diversi studi hanno dimostrato che, nella cachessia, un fattore prognostico favorevole è il trattamento precoce della perdita di peso; per questa ragione, negli ultimi anni è stata rivolta molta attenzione al supporto nutrizionale nel paziente oncologico. In

effetti l'aumento dell'assunzione di cibo può contribuire in questi pazienti a migliorare la qualità di vita, la tollerabilità e la risposta globale alla chemioterapia. Negli esperimenti da noi condotti sono state impiegate dosi di cisplatino di 1 mg/kg die, per tre giorni consecutivi, al fine di riprodurre una situazione simile a quella riscontrata nell'uomo. I risultati ottenuti dimostrano per la prima volta che il trattamento con JMV 2894 e con hexarelin è in grado di antagonizzare la perdita di peso prodotta dal cisplatino, permettendo un recupero significativo del peso corporeo che viene riportato a un livello simile a quello degli animali di controllo che non hanno ricevuto nessun trattamento. L'effetto positivo di JMV 2894 sul recupero del peso corporeo si evidenzia in tempi brevi, indicando che tale composto potrebbe divenire il capostipite di nuovi farmaci utili per contrastare alcune forme di cachessia. Tra i composti studiati, alcuni non mostrano alcuna efficacia, come ad esempio JMV 2903, che è risultato privo di effetti sia endocrini che extraendocrini. La complessità delle vie implicate in questi effetti è ben testimoniata dai risultati ottenuti con JMV 2951. Questo composto è molto attivo nello stimolare la secrezione di GH già a partire da dosi basse e nel ratto giovane-adulto stimola efficacemente l'assunzione di cibo nelle 2 ore successive alla sua somministrazione. Sulla base di queste caratteristiche JMV 2951 può essere considerato un agonista completo del GHS-R1a. Tuttavia, la somministrazione ripetuta per 11 giorni non porta a una riduzione degli effetti del cisplatino. Una possibile spiegazione è che le dosi somministrate siano troppo elevate e possano provocare, nel tempo, una desensibilizzazione del recettore e quindi un minor effetto globale sul recupero di peso corporeo. Per questo composto, sarebbe quindi interessante provare un ambito di dosi inferiore a quello impiegato in questa ricerca.

Per quanto riguarda invece il composto JMV 2894, il più attivo di tutti sul recupero del peso corporeo, è probabile che il dosaggio prescelto (320 µg/kg) sia quello ottimale, in quanto tale dose si è dimostrata particolarmente attiva anche sulla funzione endocrina, mentre a dosi inferiori (160 µg/kg) non è attivo né sul rilascio di ormone somatotropo né sul comportamento alimentare. JMV 2986, similmente a JMV 2951, è sicuramente un potente agonista del GHS-R1a, in quanto già a dosi modeste, provoca uno stimolo massimale della secrezione somatotropa. Tuttavia, il fatto che tale composto si sia rivelato inefficace nell'influenzare l'assunzione di cibo nel ratto normale e nel migliorare il recupero ponderale nel ratto con

cachessia da cisplatino, porta a supporre che il GHS-R1a non sia l'unico recettore coinvolto in questi effetti e che JMV 2894 possa agire anche mediante l'interazione con altri recettori, per ora sconosciuti. A sostegno di tale ipotesi, un numero sempre crescente di evidenze sperimentali suggerisce che la capacità di legare il GHS-R1a non sia un presupposto sufficiente per spiegare tutte le attività biologiche dei GHS. In particolare, composti che presentano una notevole affinità per il GHS-R1a e che sono degli efficaci secretagoghi del GH, non sempre sono attivi anche sul comportamento alimentare e, viceversa, composti che sono deboli agonisti per il GHS-R1a, mostrano invece un effetto di stimolo sull'assunzione di cibo (*Torsello, Luoni et al. 1998*)(*Muccioli, Baragli et al. 2007*).

Inoltre bisogna tenere in considerazione che il legame e l'attivazione del GHS-R1a da parte di ghrelin prevede che il ligando interagisca con una tasca formata da aminoacidi polari e non polari, presenti rispettivamente tra il secondo e terzo e tra il sesto e settimo dominio transmembrana. Generalmente i GHS si legano alla tasca situata nella regione del terzo dominio transmembrana, anche se per alcune di queste molecole sono stati individuati anche altri possibili siti di legame sul GHS-R1a. Alla luce di tali considerazioni, non è pertanto da escludere che il composto JMV 2894, a differenza degli altri, possa legarsi alla tasca principale e anche ad uno di questi siti. La capacità delle diverse molecole di legarsi in corrispondenza di particolari posizioni critiche del recettore potrebbe a sua volta riflettersi in una diversa efficienza nell'attivazione dei sistemi intracellulari di trasduzione del segnale, spiegando almeno in parte i diversi effetti osservati.

La stretta correlazione tra l'assunzione di cibo e le variazioni di peso corporeo ha suggerito che l'incremento ponderale osservato negli animali trattati con GHS e cisplatino fosse determinato da un maggiore consumo di cibo rispetto agli animali di controllo trattati con il solo cisplatino. Tuttavia, i nostri risultati sul consumo di cibo totale negli 11 giorni di trattamento non suffragano questa ipotesi, in quanto la quantità di cibo consumata non era significativamente differente tra i vari gruppi di trattamento. Diverse evidenze sperimentali attestano che ghrelin e alcuni GHS modificano il bilancio energetico degli animali da esperimento, promuovendo un accumulo di tessuto adiposo e una riduzione del metabolismo lipidico.

Data la mancanza di correlazione tra aumento ponderale e quantità di cibo assunta, è plausibile che l'effetto positivo osservato sul peso degli animali sia

attribuibile ad un aumento dei depositi adiposi. Anche in questo caso, i nostri risultati non permettono di dimostrare questa ipotesi, in quanto i depositi adiposi esaminati (perirenale, epididimale e sottocutaneo) non sono stati modificati in maniera significativa da nessuno dei trattamenti.

Uno degli aspetti clinicamente rilevanti della cachessia è la perdita di massa muscolare. Sebbene la patogenesi di tale fenomeno non sia stata ancora completamente chiarita, essa ha certamente una base multifattoriale e riflette un disequilibrio del turnover tra sintesi e degradazione delle proteine a livello muscolare. A tale riguardo, diverse ricerche hanno ampiamente documentato il ruolo svolto nella degradazione proteica muscolare dal sistema proteolitico ATP-dipendente della ubiquitina/proteasoma, a cui appartiene anche il fattore Muscle Ring-Finger Protein-1 (MuRF-1), una E3 ligasi (Koyama, Hata et al. 2008). Recentemente, è stato inoltre dimostrato che topi *knock-out* per tale gene presentano una resistenza all'atrofia muscolare di diversa origine e che, al contrario, l'espressione genica di MuRF-1 aumenta in diverse condizioni patologiche caratterizzate da atrofia muscolare, quali ad esempio la cachessia (Yamamoto, Ikeshita et al. 2008). D'altro canto, tra i diversi fattori protettivi nei confronti del processo di atrofia muscolare, l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) svolge sicuramente un ruolo predominante. E' noto infatti che il GH e l'IGF-1 esercitano effetti anabolici sulla massa muscolare, promuovendo l'assunzione di aminoacidi da parte delle cellule, stimolando la sintesi di proteine e diminuendone contemporaneamente il catabolismo. Era pertanto ipotizzabile che i GHS, in virtù della loro attività GH-rilasciante e della presenza del GHS-R1a nel muscolo (Yamamoto, Ikeshita et al. 2008) potessero esercitare un effetto protettivo a tale livello. Per verificare questa ipotesi, abbiamo quindi analizzato, l'espressione genica di MuRF-1 nel muscolo. I risultati ottenuti dimostrano che i livelli dell'mRNA per MuRF-1 nel muscolo degli animali trattati per 11 giorni con JMV 2894 sono significativamente inferiori rispetto a quelli osservati negli animali trattati con cisplatino e soluzione fisiologica. Questo risultato suggerisce che l'azione anticatabolica di JMV 2894 sia probabilmente, almeno in parte, mediata dall'inibizione di MuRF-1. Anche hexarelin tende a produrre un analogo andamento, anche se, in questo caso, non è stata raggiunta la significatività statistica. Ulteriori ricerche saranno necessarie per stabilire se anche i composti JMV 2952, JMV 2986 e JMV 2903 possano avere effetti sull'espressione genica di

MuRF-1 e se, in generale, i GHS possano incrementare la massa muscolare. Inoltre, per consolidare questo dato, sarebbe importante approfondire anche l'eventuale coinvolgimento di altri fattori del complesso ubiquitina-proteosoma. I dati di questa ricerca dimostrano per la prima volta che i GHS possono prevenire la perdita di peso indotta dalla somministrazione di cisplatino e che l'aumento ponderale ottenuto non dipende da un aumento della massa grassa o dall'incremento dell'assunzione totale di cibo, bensì da un'azione anticatabolica esercitata a livello muscolare.

In virtù di queste proprietà, i GHS potrebbero quindi rappresentare un nuovo e valido strumento terapeutico capace di contrastare alcune forme di cachessia. Il trattamento con GHS potrebbe anche permettere un aumento dell'efficacia delle terapie antitumorali a base di cisplatino e potrebbe contribuire al miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

Il modello di obesità indotto in topi giovani-adulti di ceppo C57BL/6J mediante la somministrazione di una dieta iperlipidica composta dal 65% di grassi (HFD) per 9 settimane ha portato ad un aumento significativo del peso corporeo. Il peso è raddoppiato rispetto a quello dei topi dello stesso ceppo alimentati con dieta standard ed il trattamento per 7 giorni con i due antagonisti EP 80317 e JMV 2959 ha indotto una riduzione del peso corporeo. Questa riduzione si è dimostrata significativa negli animali trattati con EP 80317, il cui peso corporeo risultava inferiore del  $3.2\% \pm 0.6$  rispetto agli obesi. E' importante considerare che la diminuzione del peso corporeo è già significativa a partire dal quinto giorno in seguito al trattamento con EP 80317.

Questa diminuzione è chiaramente evidenziabile nelle analisi microtomografiche effettuate con Skyscan 1176, dove la riduzione del peso corporeo ben correlava con una minore deposizione di tessuto adiposo. Come atteso, la quantità di grasso corporeo è maggiore nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi.

Esperimenti con trattamenti più prolungati potranno probabilmente fornire una risposta definitiva sull'efficacia delle nostre terapie sperimentali.

Poiché è nota la correlazione tra obesità e insorgenza di diabete abbiamo ritenuto importante considerare il ruolo svolto dalle incretine e a tal proposito abbiamo determinato i livelli di *glucagon-like peptide-1*. Essi si sono rilevati essere più elevati negli animali obesi rispetto ai controlli, e il trattamento con EP 80317 e

JMV 2959 non variava in modo significativo i livelli circolanti di GLP-1. Il trattamento con gli stessi analoghi non alterava inoltre i valori di glicemia determinati dopo un digiuno di 12h. I livelli di insulina circolante sono risultati simili tra i differenti gruppi di trattamento e indipendenti dalla dieta.

In considerazione del ruolo sempre più rilevante svolto dal tessuto adiposo nella sindrome metabolica, abbiamo dosato i livelli plasmatici delle adipochine leptina e resistina. Nei topi obesi, in accordo con la letteratura, i livelli di leptina sono risultati essere significativamente più elevati rispetto ai controlli e il trattamento con JMV 2959 aumentava in modo significativo i livelli di leptina rispetto agli animali obesi mentre non variava i livelli di resistina; questi ultimi nei topi obesi sono risultati essere più elevati rispetto ai controlli.

Considerato il ruolo svolto da ghrelin nella regolazione dell'assunzione di cibo abbiamo misurato i livelli di tale ormone; essi risultano significativamente diminuiti nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi ma non risultano variati in seguito ad entrambi i trattamenti. Abbiamo inoltre dosato i livelli circolanti di PYY, fattore che al contrario di ghrelin inibisce l'assunzione di cibo, e i risultati da noi ottenuti dimostrano che i trattamenti non inducono modificazioni significative nei differenti gruppi di animali.

E' ben nota tendenza della dieta ad alto contenuto di grassi a indurre un aumento dei valori plasmatici di trigliceridi, effetto che si è verificato anche nel nostro esperimento sebbene tale aumento non sia risultato statisticamente significativo rispetto ai topi alimentati con dieta standard. Inoltre, i trattamenti con i diversi antagonisti non hanno causato variazioni dei livelli circolanti di trigliceridi.

Considerando anche l'associazione tra obesità e stato infiammatorio, come ben documentato dalle interazioni tra citochine, macrofagi, adipociti e cellule epiteliali (*Stephen D. Hursting, 2012*), abbiamo misurato mediante real-time PCR i livelli di mRNA del TNF- $\alpha$  e di MCP-1 nei depositi di grasso epididimale di topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso, i livelli di mRNA di TNF- $\alpha$  erano aumentati nei depositi adiposi epididimali dei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e tali valori diminuivano significativamente in seguito al trattamento con JMV 2959. I livelli di MCP-1 erano aumentati nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e il trattamento con entrambi i composti portava ad una diminuzione, anche se non

significativa, dei livelli di mRNA di MCP-1. Questo può far pensare ad un'azione protettiva dei nostri composti nell'insorgenza dell'infiammazione ma ulteriori studi saranno necessari per comprendere meglio come il meccanismo d'azione ed anche se un trattamento più prolungato nel tempo possa essere utile per dimostrare con sicurezza l'effetto dei nostri trattamenti sperimentali.

Infine considerando il ruolo della lipina nell'adipogenesi e la sua importanza per la corretta differenziazione adipocitaria, abbiamo voluto misurare mediante real-time PCR i livelli di lipina nel tessuto adiposo epididimale di topi alimentati a dieta standard e a dieta ad alto contenuto di grassi.

Come atteso i livelli di mRNA della lipina erano diminuiti nel grasso epididimale dei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi e il trattamento con il composto JMV 2959 induceva un aumento, anche se non significativo, dei livelli di mRNA della lipina.

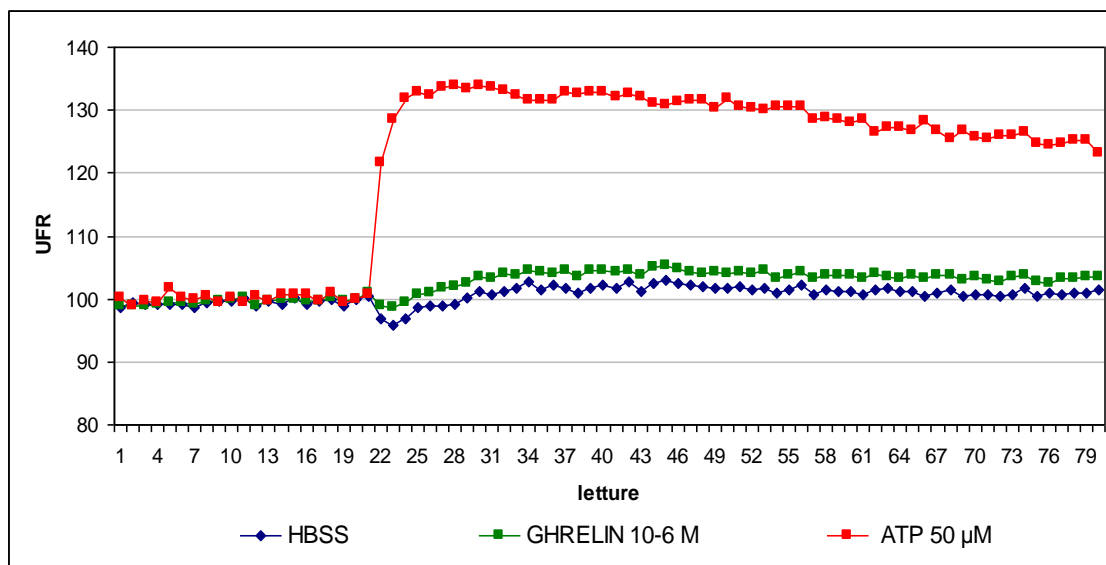
Dai risultati della nostra ricerca nel modello di obesità da dieta iperlipidica emerge che il composto EP 80317 si dimostra essere più efficace nella riduzione del peso corporeo degli animali alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi, mentre il composto JMV 2959 mostra effetti protettivi nell'insorgenza dell'infiammazione. Per consolidare queste osservazioni, sarebbe importante prolungare il periodo di trattamento con i nostri antagonisti ed approfondire anche l'eventuale coinvolgimento di altre citochine infiammatorie.

Ulteriori studi saranno necessari per definire come i nostri antagonisti agiscano sul recettore GHS-R1a e quali vie di trasduzione del segnale siano coinvolte nelle loro azioni.

In conclusione possiamo affermare che i nuovi composti peptido-mimetici che abbiamo caratterizzato potrebbero costituire un buon punto di partenza per lo sviluppo di farmaci utili nella terapia della cachessia e dell'obesità. Andando ad analizzare finemente le loro proprietà chimiche strutturali si potrebbe inoltre capire quali sono le sostituzioni maggiormente coinvolte nelle loro attività funzionali per progettare nuovi composti dotati di sempre maggior selettività.

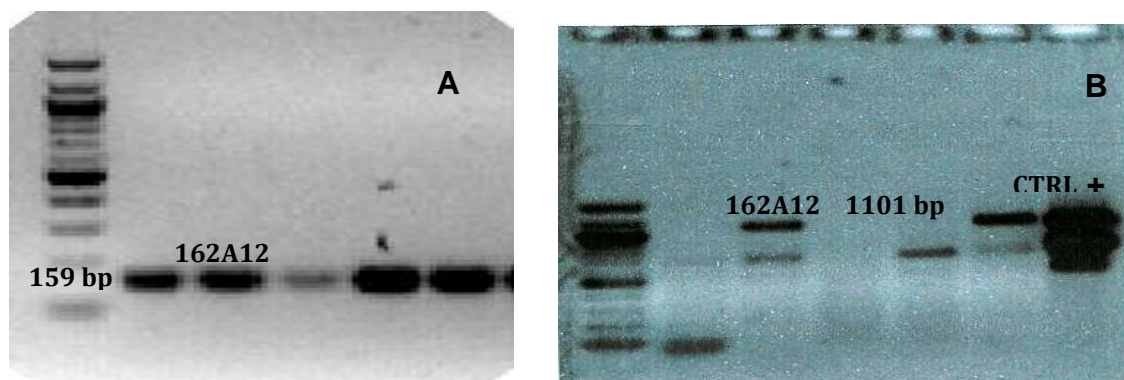
***Figure***





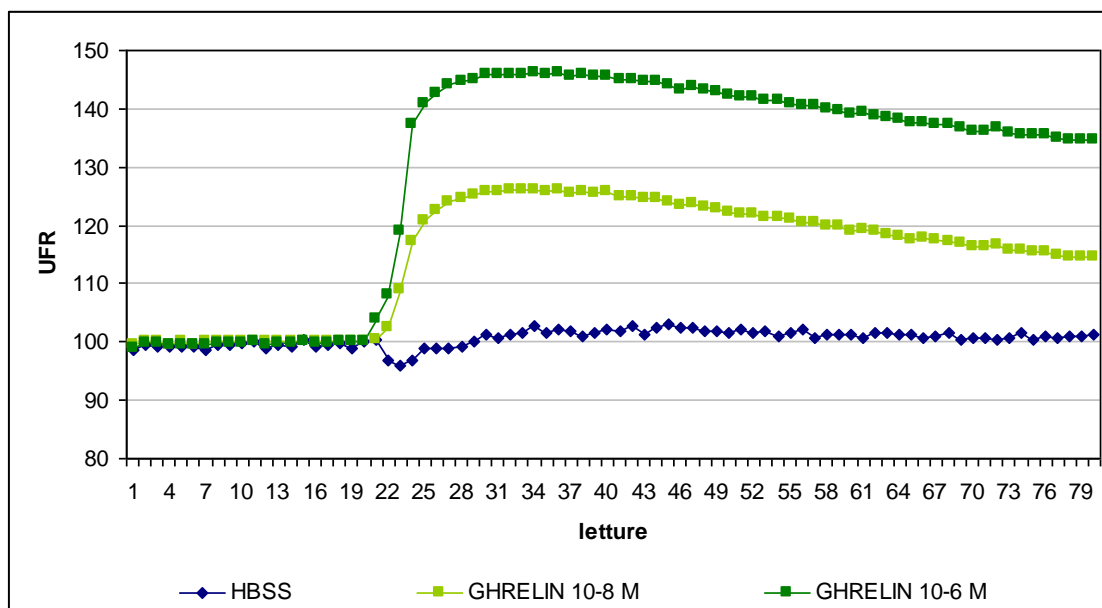
**Figura 1:** Mobilizzazione del calcio intracellulare indotta da HBSS, ghrelin  $10^{-6}$  M e ATP 50  $\mu$ M nella linea cellulare CHO. La lettura è stata condotta per 20 letture prima e 60 dopo. UFR = unità di fluorescenza relativa.

L'iniezione di HBSS non ha provocato variazioni nella fluorescenza basale; analoga risposta si è ottenuta con l'iniezione di ghrelin  $10^{-6}$  M. La funzionalità del sistema è stata verificata iniettando ATP 50  $\mu$ M che ha invece provocato la mobilizzazione del calcio intracellulare e un cospicuo aumento della fluorescenza.



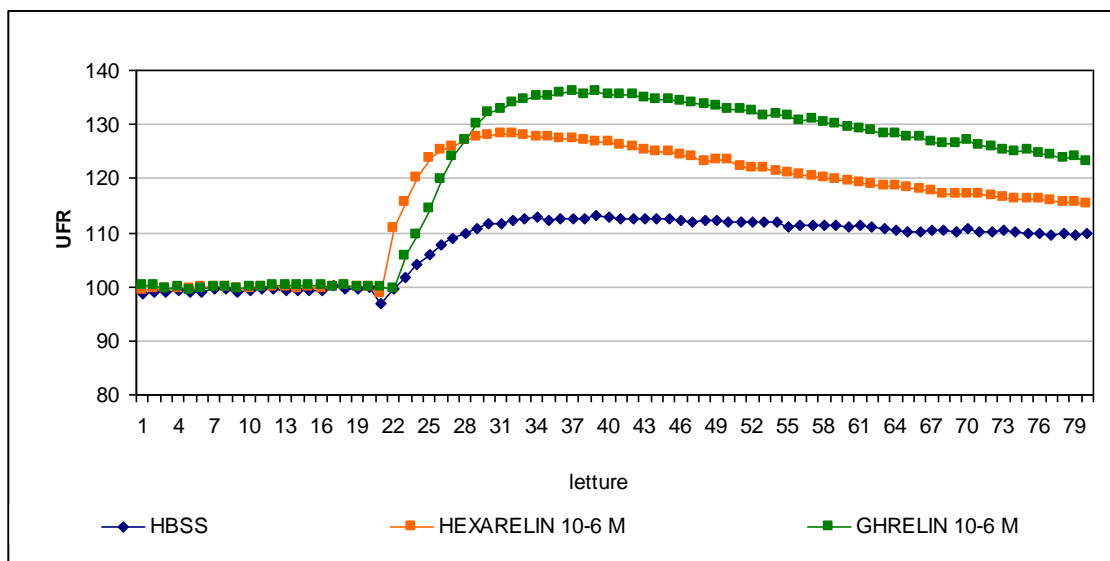
**Figura 2:** L'espressione di mRNA del GHS-R1a è stata valutata mediante analisi RT-PCR condotta con primer specifici nei diversi cloni ottenuti. **A** Utilizzando primer che amplificano una regione genica di 159bp, più cloni risultano positivi per il gene in esame, seppure con livelli di espressione differenti. **B** L'analisi RT-PCR eseguita con primer che amplificano l'intera sequenza del gene di interesse ha evidenziato che solo nel clone CHO162A12 si ottiene il prodotto di amplificazione a 1101bp. CTRL + = controllo positivo, costituito dal plasmide hGHS-R1a.

L'espressione del recettore nel clone selezionato, denominato CHO162A12, è stata verificata mediante analisi RT-PCR. La presenza della banda specifica sia a 159 bp (figura 2A) sia a 1101bp (figura 2B) ha confermato l'esito positivo della transfezione.



**Figura 3:** Mobilizzazione del calcio intracellulare indotta da ghrelina nel clone CHO162A12. La lettura è stata condotta per 20 letture prima e 60 dopo; la risposta allo stimolo è pressoché immediata, e già dopo 10 secondi l'intensità del segnale inizia lentamente a diminuire. UFR = unità di fluorescenza relativa.

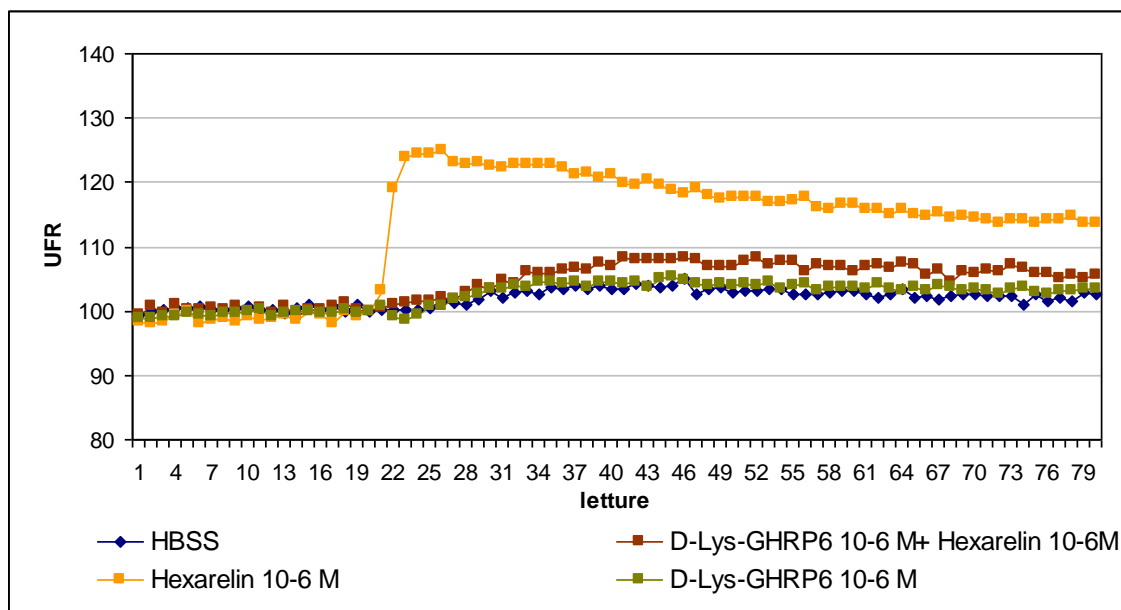
La funzionalità del recettore è stata verificata con il saggio fluorimetrico di mobilizzazione del calcio intracellulare utilizzando ghrelina, il ligando endogeno del GHS-R1a, alla concentrazione di  $10^{-8}$  M e  $10^{-6}$  M; entrambe le concentrazioni hanno attivato il recettore, provocando un aumento della fluorescenza e, come atteso, l'effetto è risultato maggiore per la concentrazione di  $10^{-6}$  M.



**Figura 4:** Mobilizzazione del calcio intracellulare indotta da ghrelin ed hexarelin nel clone CHO162A12. La lettura è stata condotta per 20 letture prima dello stimolo e 60 dopo. UFR = unità di fluorescenza relativa.

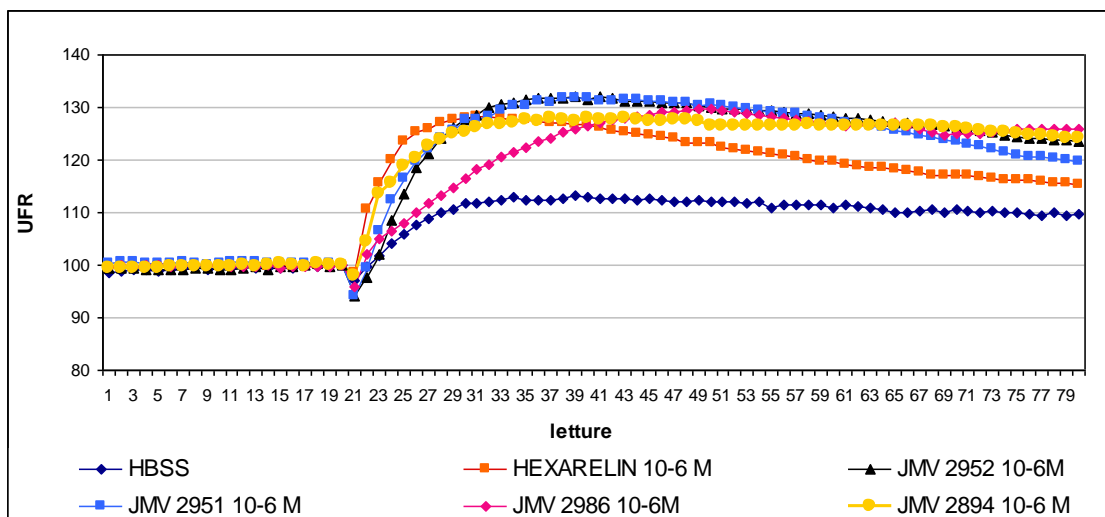
Hexarelin, un GHS peptidico la cui capacità di stimolare la secrezione di GH e l'appetito è stata ben caratterizzata nel nostro laboratorio, si è dimostrata efficace nello stimolare in modo dose-dipendente il GHS-R1a espresso dal clone e con intensità paragonabile a quella di ghrelin.

Hexarelin alla concentrazione  $10^{-6}$  M è stata quindi utilizzata come composto di riferimento nei successivi esperimenti.



**Figura 5:** Mobilizzazione del calcio intracellulare indotta da D-Lys-GHRP6 ed hexarelin nel clone CHO162A12. La lettura è stata condotta per 20 letture prima dello stimolo e 60 dopo. UFR = unità di fluorescenza relativa.

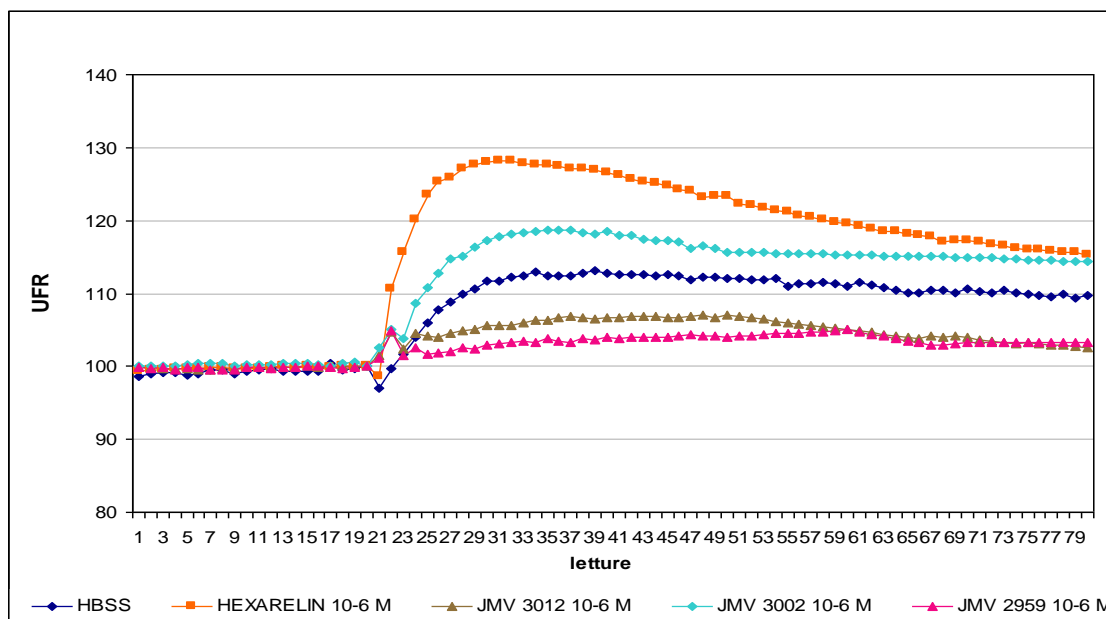
Per verificare la funzionalità del sistema abbiamo analizzato la risposta del clone CHO162A12 a D-Lys-GHRP6, un noto antagonista del GHS-R1a. Come atteso, l'iniezione dell'antagonista nei pozzetti contenenti le cellule non induce mobilizzazione del calcio intracellulare. Inoltre D-Lys-GHRP6 alla concentrazione  $10^{-6}$  M è in grado di inibire il rilascio di calcio dai depositi intracellulari indotto da hexarelin.



**Figura 6:** Mobilizzazione del calcio intracellulare indotta da composti classificati come agonisti nel clone CHO162A12. La lettura è stata condotta per 20 letture prima dello stimolo e 60 dopo. UFR = unità di fluorescenza relativa.

Come atteso la stimolazione di hexarelin ha portato ad un aumento massivo della mobilizzazione del calcio intracellulare e così anche per JMV 2951, JMV 2952 e JMV 2894.

La mobilizzazione del calcio intracellulare si è dimostrata minore in seguito alla stimolazione con il composto JMV 2986.

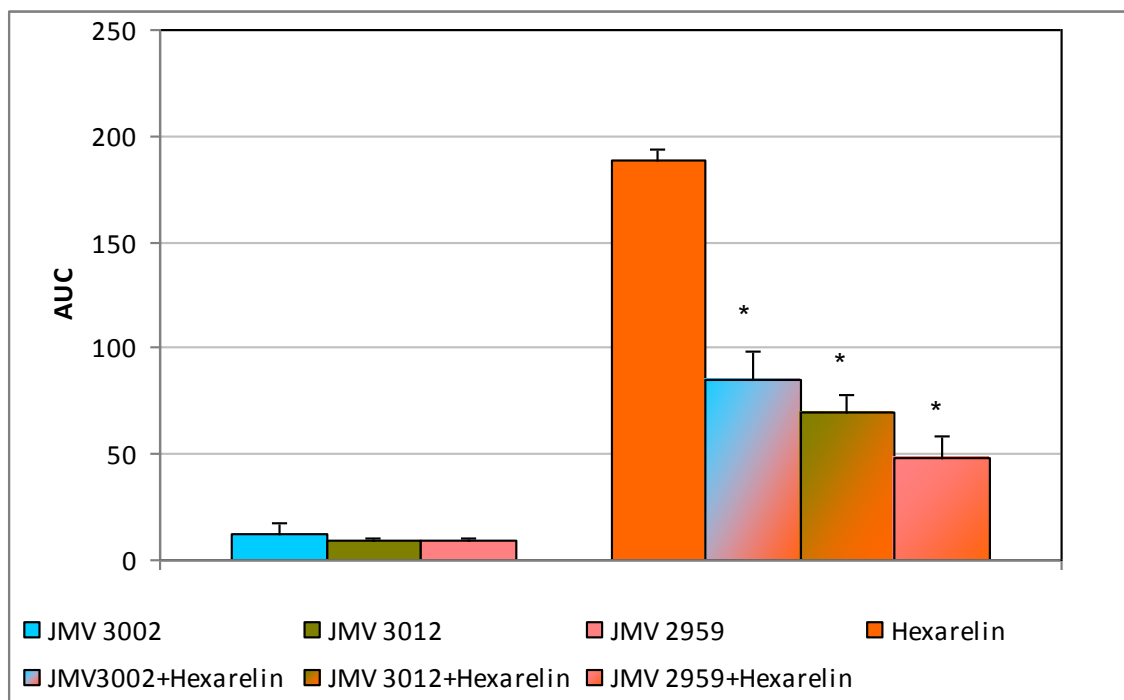


**Figura 7:** Mobilizzazione del calcio intracellulare indotta da composti classificati come antagonisti nel clone CHO162A12. La lettura è stata condotta per 20 letture prima dello stimolo e 60 dopo. UFR = unità di fluorescenza relativa.

Come atteso la stimolazione di hexarelin ha portato ad un aumento massivo della mobilizzazione del calcio intracellulare.

La mobilizzazione del calcio intracellulare si è dimostrata nulla in seguito alla stimolazione con i composti JMV 2959 e JMV 3012.

Il composto JMV 3002 ha mostrato una parziale mobilizzazione del calcio intracellulare



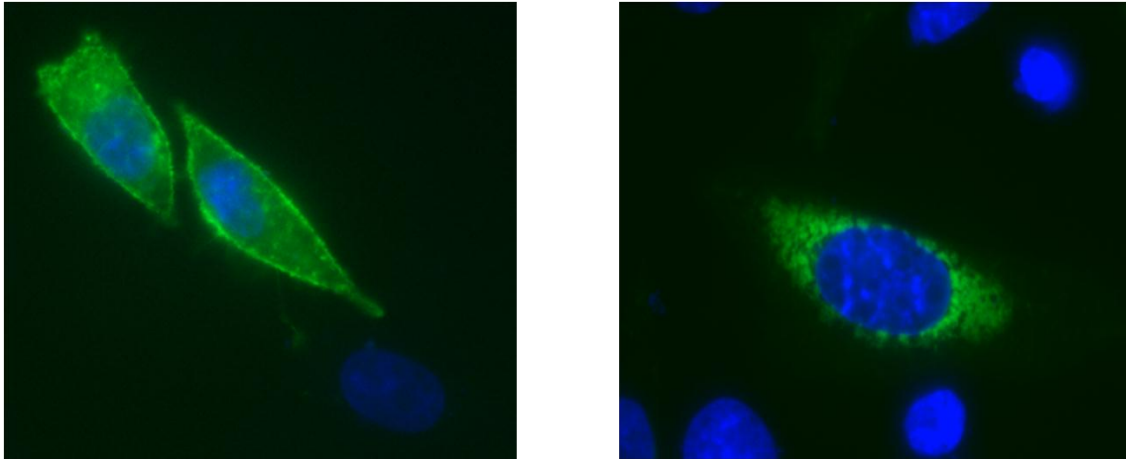
**Figura 8:** Mobilizzazione del calcio intracellulare nel clone CHO162A12 indotta da hexarelin, JMV 3002, JMV 3012 e JMV 2959 e dai composti in associazione ad hexarelin. Per tutti i composti è stata usata la concentrazione  $10^{-6}$  M. AUC: area sotto la curva. L'incremento è stato espresso come variazione dell'area sottesa alla curva prima e dopo la stimolazione.

Come atteso la stimolazione di hexarelin ha portato ad un aumento massivo della mobilizzazione del calcio intracellulare.

Gli antagonisti JMV 3002, JMV 3012 e JMV 2959 non provocano rilascio di calcio dai depositi intracellulari e inibiscono la risposta indotta da hexarelin.

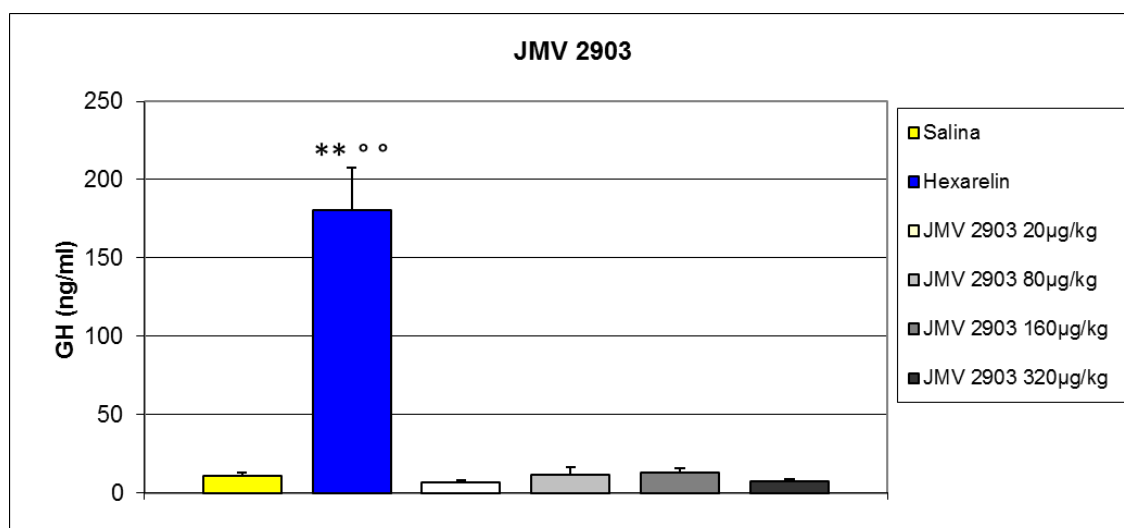
\* =  $p < 0,05$  vs hexarelin  $10^{-6}$  M





**Figura 9:** Localizzazione del recettore A: prevalentemente sulla membrana citoplasmatica in condizioni basali e B dopo internalizzazione in seguito alla stimolazione con hexarelin.

Mediante il microscopio confocale abbiamo potuto osservare la localizzazione del recettore GHS-R1a prima della stimolazione con l'agonista noto hexarelin e la sua internalizzazione.

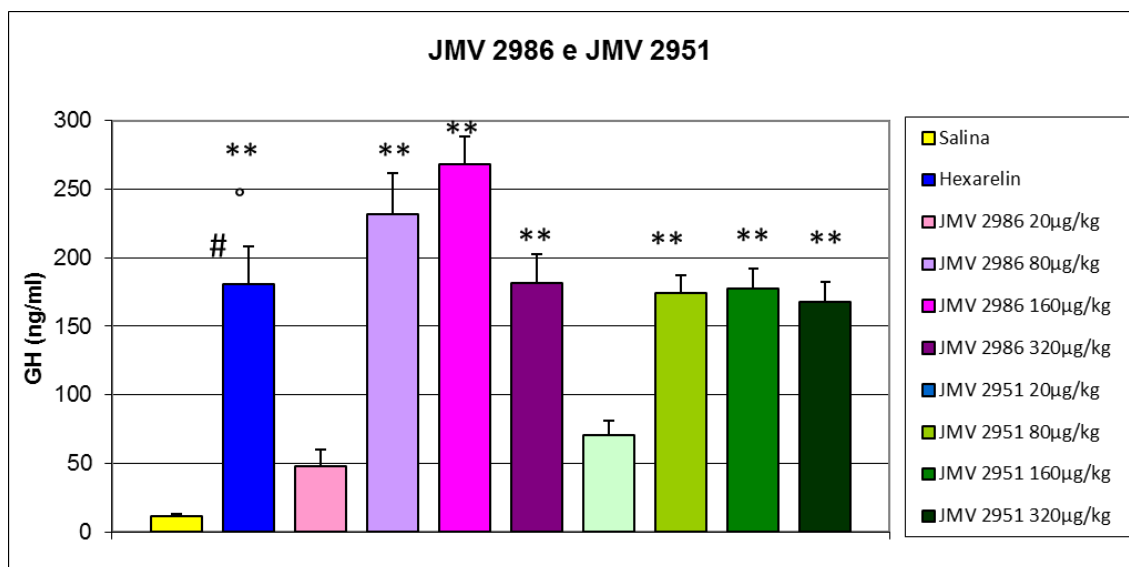


**Figura 10:** Effetto della somministrazione di JMV 2903 sul rilascio di GH.

I ratti neonati di 10 giorni di vita sono stati trattati s.c. con dosi crescenti della molecola peptidomimetica: 20, 80, 160, 320 µg/kg. La quantità di GH plasmatico è stata determinata tramite dosaggio immunoenzimatico (EIA) e misurata in ng/ml. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

\*\*  $p < 0.001$  hexarelin vs salina

°°  $p < 0.001$  hexarelin vs JMV 2903 20, 80, 160, 320 µg/kg



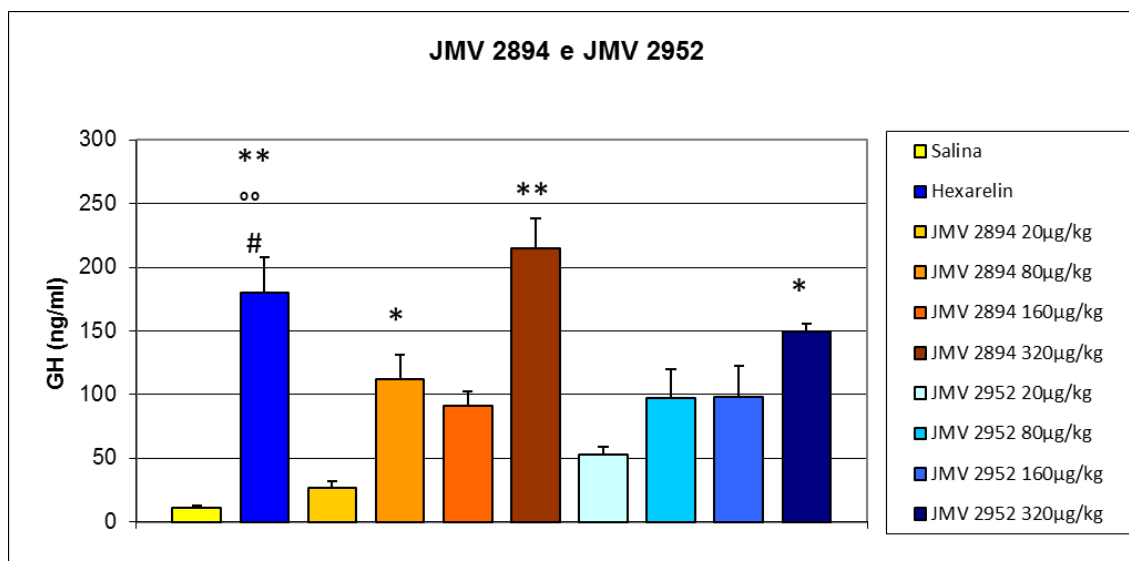
**Figura 11:** Effetto della somministrazione di JMV 2986 e JMV 2951 sul rilascio di GH.

I ratti neonati di 10 giorni di vita sono stati trattati come descritto nella Figura 10. La quantità di GH plasmatico è stata determinata come descritto in Figura 10.

\*\*  $p < 0.001$  hexarelin, JMV 2986 80, 160, 320 µg/kg e JMV 2951 80, 160, 320 µg/kg vs salina

°  $p < 0.05$  hexarelin vs JMV 2986 20 µg/kg

#  $p < 0.05$  hexarelin vs JMV 2951 20 µg/kg



**Figura 12:** Effetto della somministrazione di JMV 2894 e JMV 2952 sul rilascio di GH.

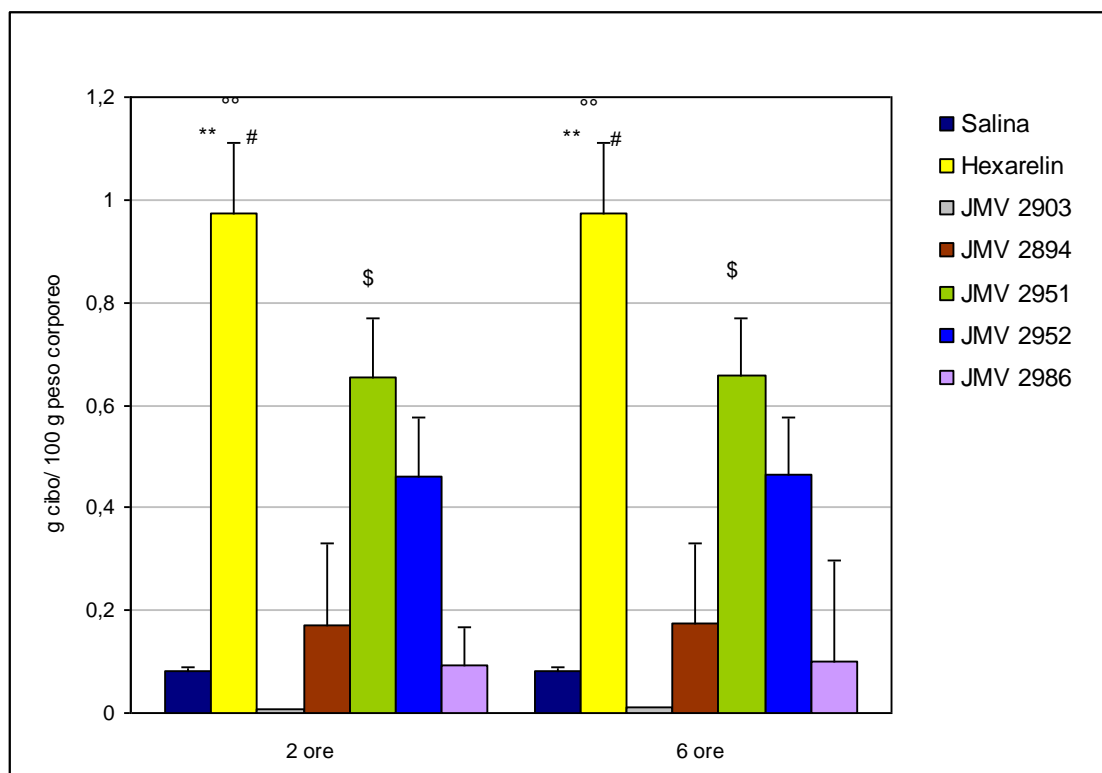
I ratti neonati di 10 giorni di vita sono stati trattati come descritto nella Figura 10. La quantità di GH plasmatico è stata determinata come descritto in Figura 10.

\*\*  $p < 0.001$  hexarelin e JMV 2894 320 µg/kg, vs salina

\*  $p < 0.001$  UMB2894 80 µg/kg e JMV 2952 320 µg/kg vs salina

°°  $p < 0.001$  hexarelin vs JMV 2894 20 µg/kg

#  $p < 0.05$  hexarelin vs JMV 2952 20 µg/kg

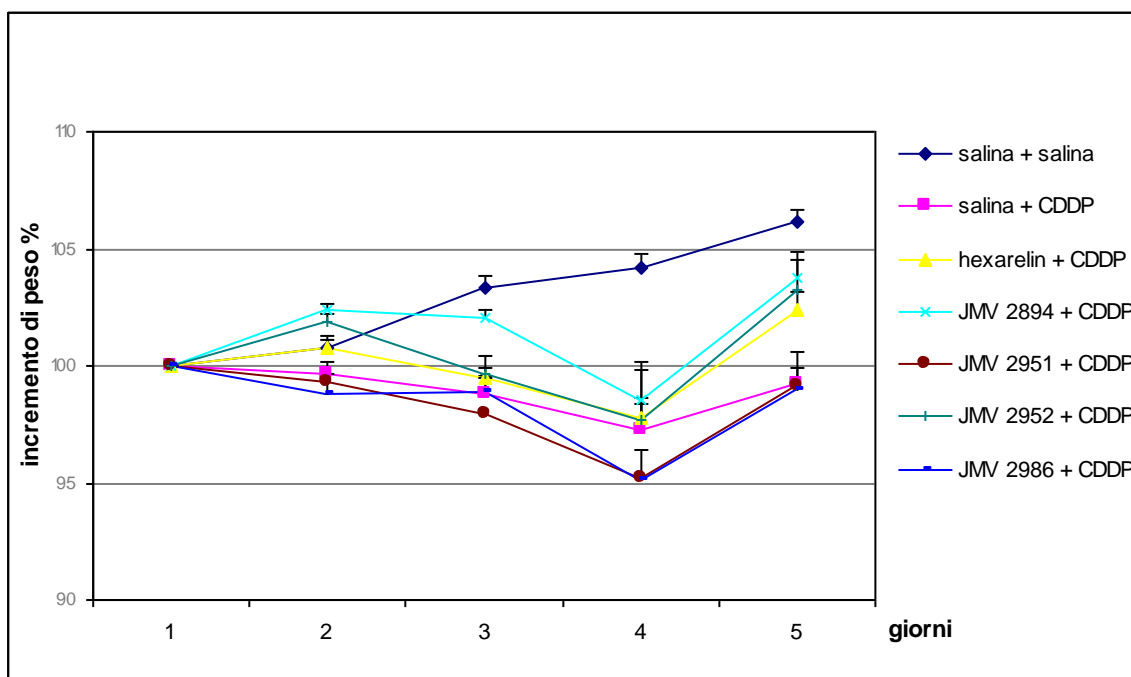


**Figura 13:** Effetto della somministrazione acuta di hexarelin, JMV 2903, JMV 2894, JMV 2951, JMV 2952 e JMV 2986 sull'assunzione di cibo.

I composti sono stati somministrati nel ratto maschio giovane-adulto, con libero accesso ad acqua e cibo, al mattino, i.p., alla dose di 160 µg/Kg; il consumo di cibo è stato valutato a due e a sei ore dall'iniezione e la quantità di cibo consumata (g) è stata normalizzata per 100 g di peso corporeo dell'animale. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

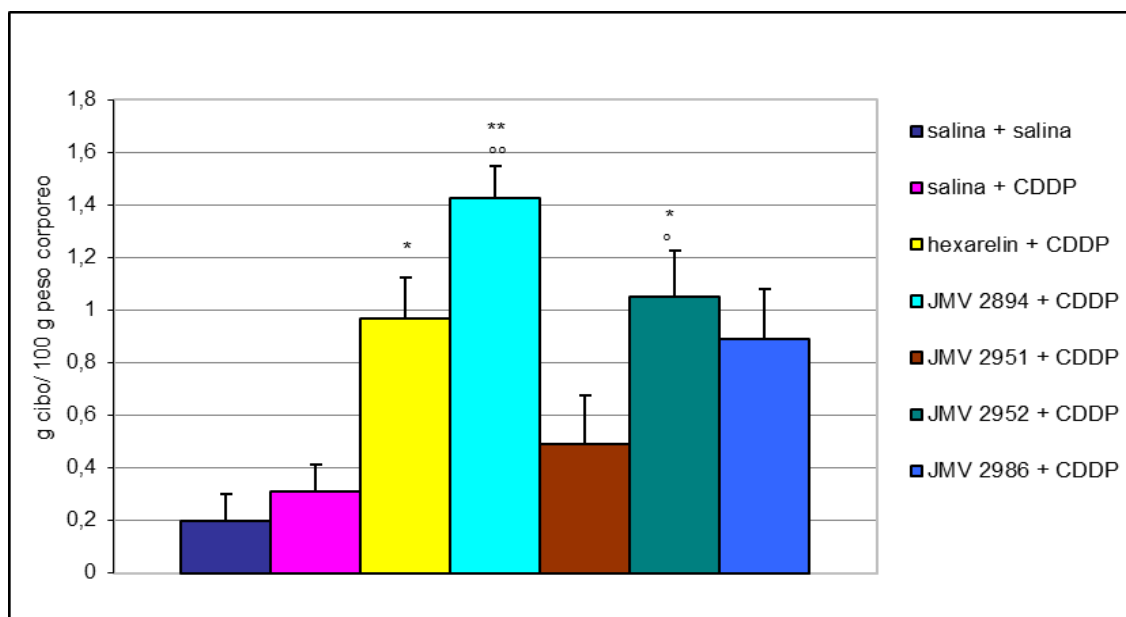
\*  $p < 0.001$  hexarelin vs salina, JMV 2903, JMV 2894, JMV 2952 e JMV 2986

°  $p < 0.005$  JMV 2951 vs salina, JMV 2903, JMV 2894 e JMV 2986



**Figura 14.:** Effetti della somministrazione prolungata, per 5 giorni, di hexarelin e dei composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 2986 e JMV 2903 sull'andamento del peso corporeo nel ratto con cachessia indotta dalla somministrazione di CDDP.

I ratti maschi giovani adulti sono stati trattati i.p., due volte al giorno (8:30 a.m. e 16:30 p.m.) con soluzione fisiologica o con hexarelin (160 µg/kg) o con i composti JMV 2951 o JMV 2952 o JMV 2894 o JMV 2986 o JMV 2903 (320 µg/kg). Trenta minuti dopo la prima iniezione, i ratti hanno ricevuto i.p., al mattino, per i primi tre giorni, soluzione fisiologica o CDDP (1 mg/kg). L'effetto sul peso corporeo è stato espresso come percentuale di incremento/decremento rispetto al valore iniziale, assunto come 100%. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.



**Figura 15:** Effetti della somministrazione prolungata, per 5 giorni, di hexarelin e dei composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 2986 e JMV 2903 nel ratto con cachessia indotta dalla somministrazione di CDDP, valutata al quinto giorno di trattamento, dopo due ore dall'iniezione.

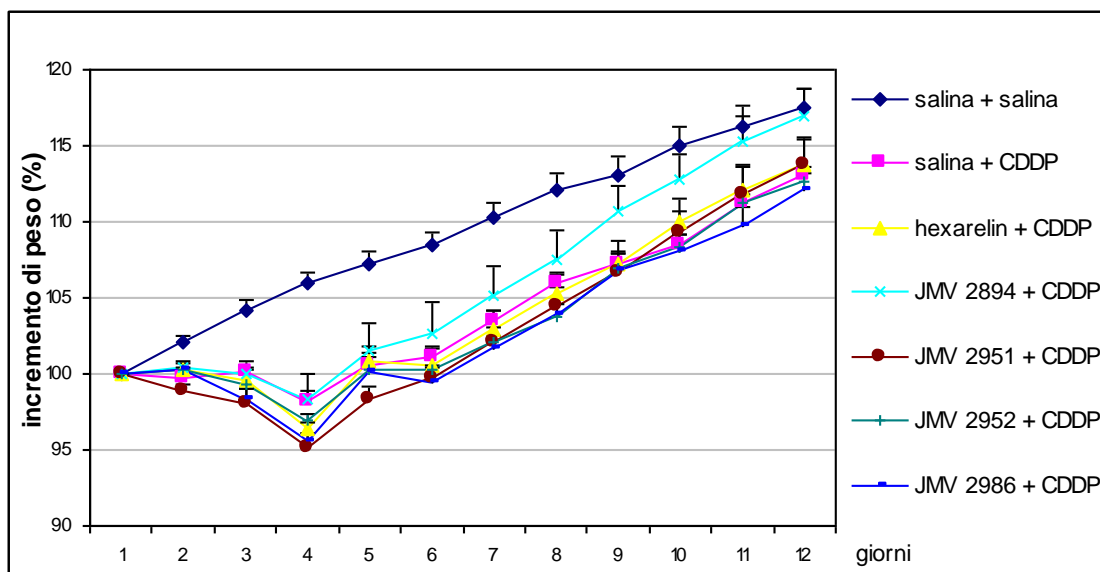
I ratti sono stati trattati come descritto nella Figura 14 e la quantità di cibo consumata (g) è stata normalizzata per 100 g di peso corporeo dell'animale.

\*\*  $p < 0.001$  JMV 2894 + CDDP vs salina

\*  $p < 0.05$  JMV 2952 + CDDP vs salina

°°  $p < 0.001$  JMV 2894 + CDDP vs CDD

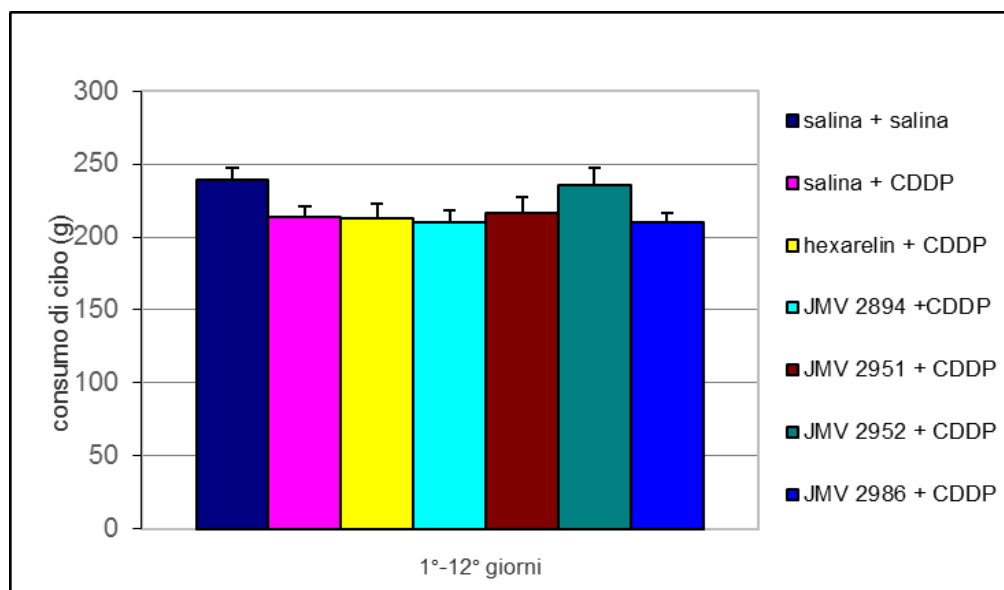
°  $p < 0.05$  JMV 2952 + CDDP vs CDDP



**Figura 16.:** Effetti della somministrazione prolungata, per 11 giorni, di hexarelin e dei composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 2986 e JMV 2903 sull'andamento del peso corporeo nel ratto con cachessia indotta dalla somministrazione di CDDP.

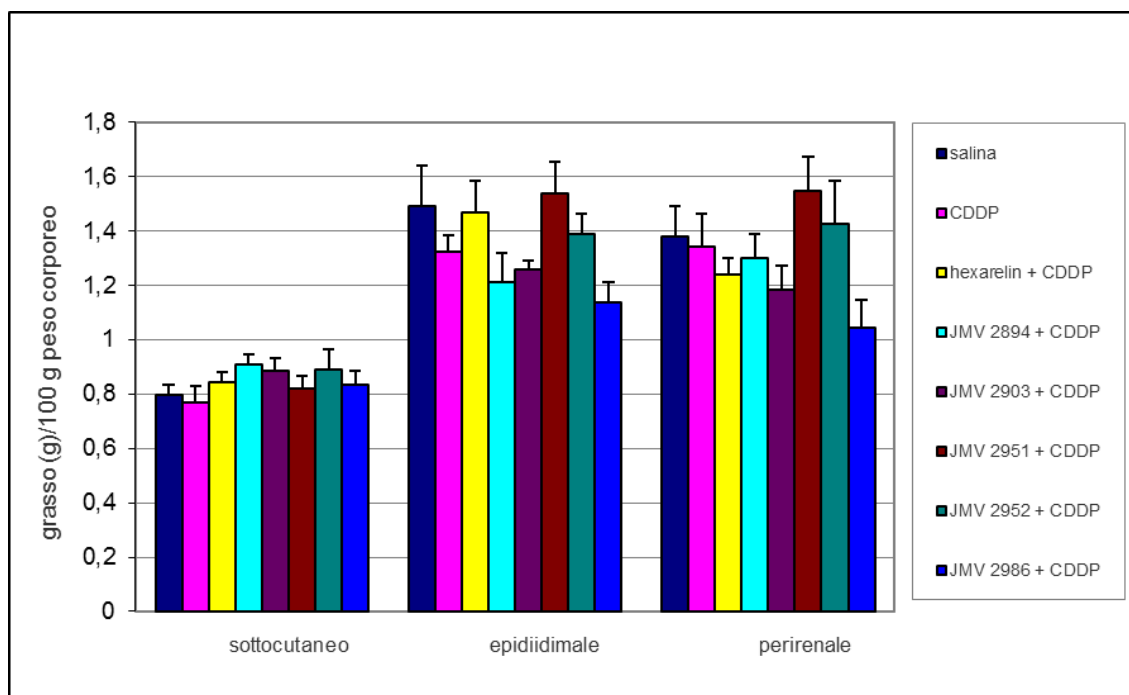
I ratti sono stati trattati come descritto in Figura 14. L'effetto sul peso corporeo è stato espresso come percentuale di incremento/decremento rispetto al valore iniziale, assunto come 100%. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.





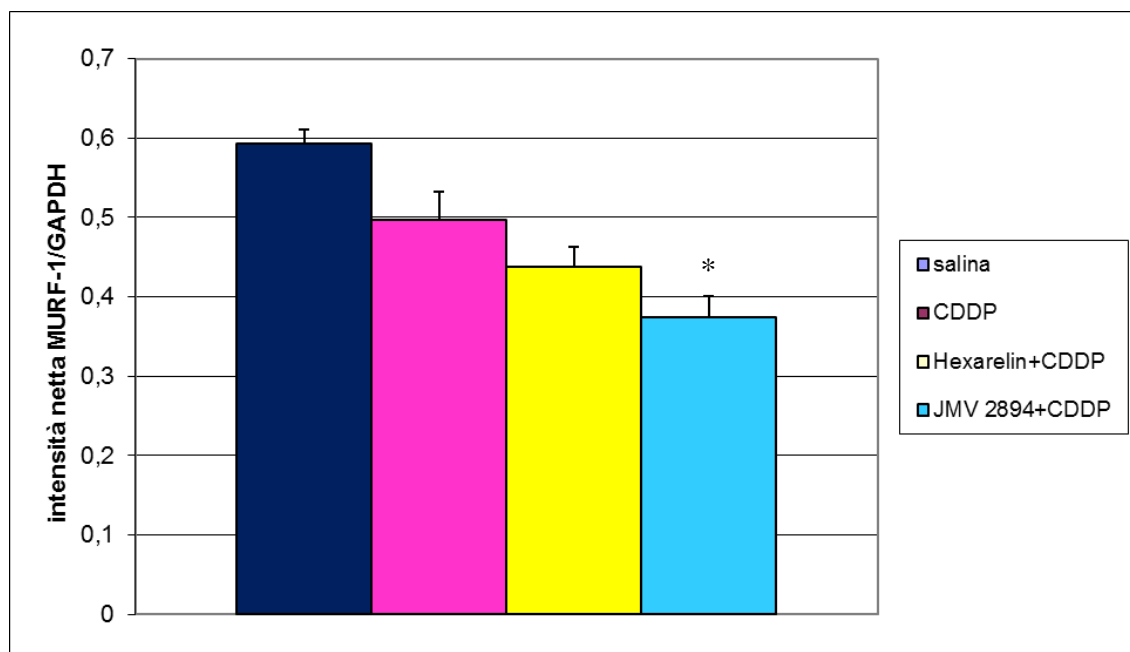
**Figura 17:** Effetti della somministrazione prolungata, per 11 giorni, di hexarelin e dei composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 2986 e JMV 2903 sulla quantità totale di cibo consumata.

Gli animali sono stati trattati come descritto in Figura 14 e la quantità totale di cibo è stata calcolata sommando i grammi di cibo consumati giornalmente da ogni ratto, nelle 24 ore.



**Figura 18:** Effetti della somministrazione prolungata, per 11 giorni, di hexarelin e dei composti JMV 2951, JMV 2952, JMV 2894, JMV 986 e JMV 2903 sulla massa dei depositi adiposi perirenale, epididimale e sottocutaneo.

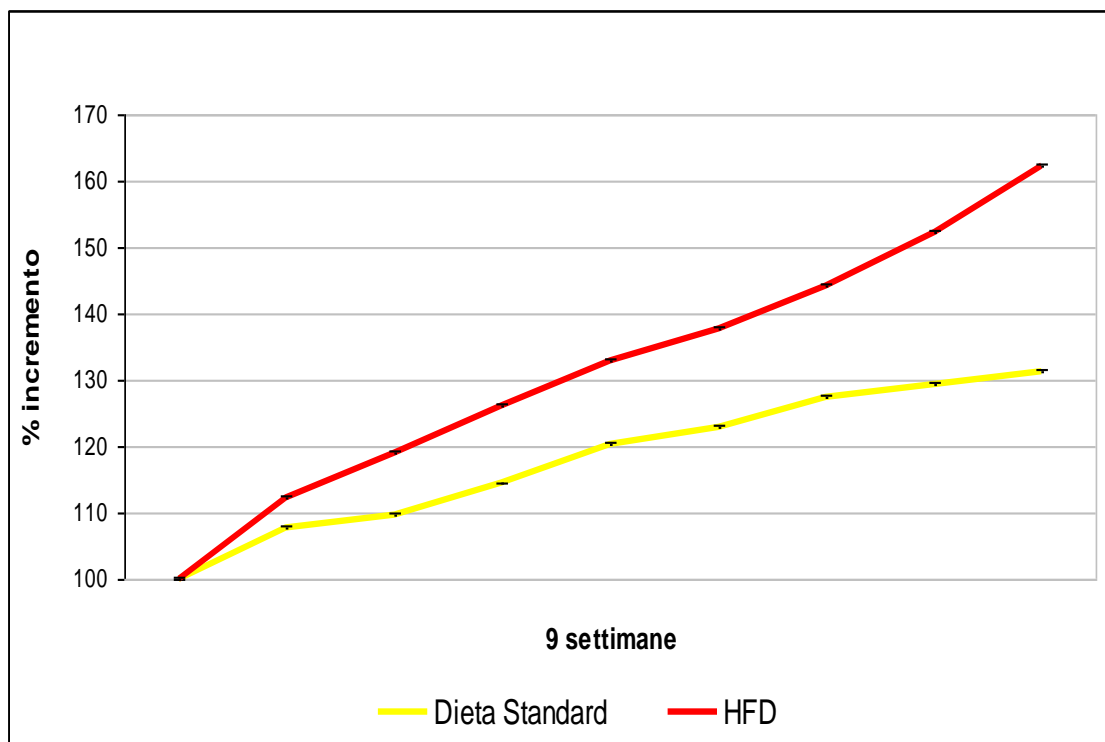
Gli animali sono stati trattati come descritto in Figura 14 e il 12° giorno sono stati sacrificati; sono stati prelevati e pesati i depositi di tessuto adiposo perirenale, epididimale e sottocutaneo; il peso dei depositi adiposi è stato normalizzato per il peso corporeo dell'animale.



**Figura 19:** Effetti della somministrazione prolungata, per 11 giorni, di hexarelin e del composto JMV 2894 sull'espressione dell'mRNA di MuRF-1 nel muscolo.

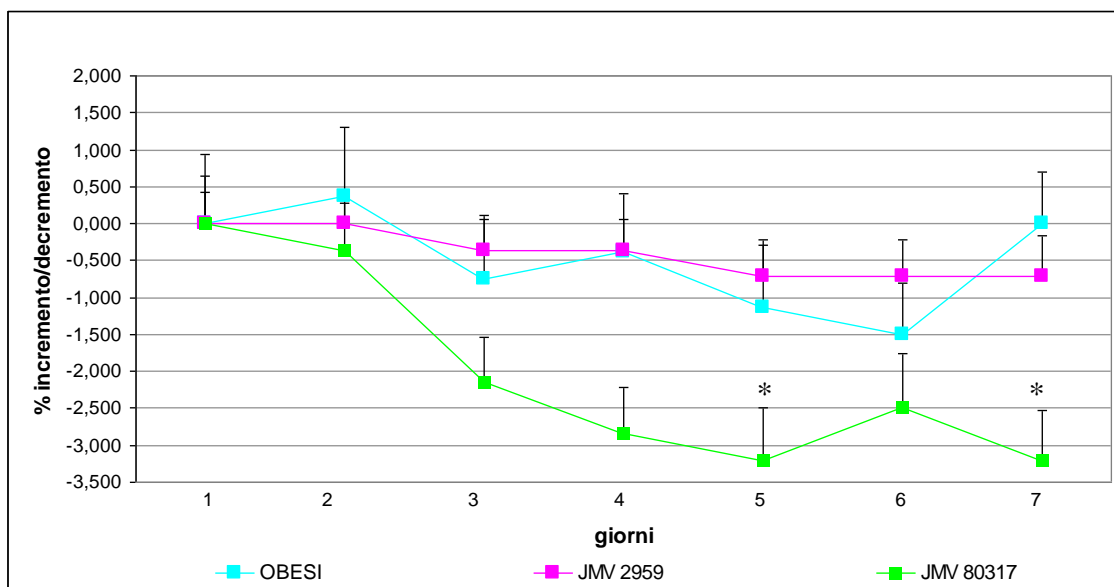
L'analisi dell'espressione genica di MuRF-1 è stata determinata mediante RT-PCR semiquantitativa; i valori, ottenuti mediante analisi densitometrica delle bande, sono stati espressi come rapporto tra intensità netta delle bande di MuRF-1 e del gene housekeeping, il GAPDH. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

\*  $p < 0.05$  vs CDDP



**Figura 20:** Effetti della somministrazione per 9 settimane di una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) e di una dieta standard.

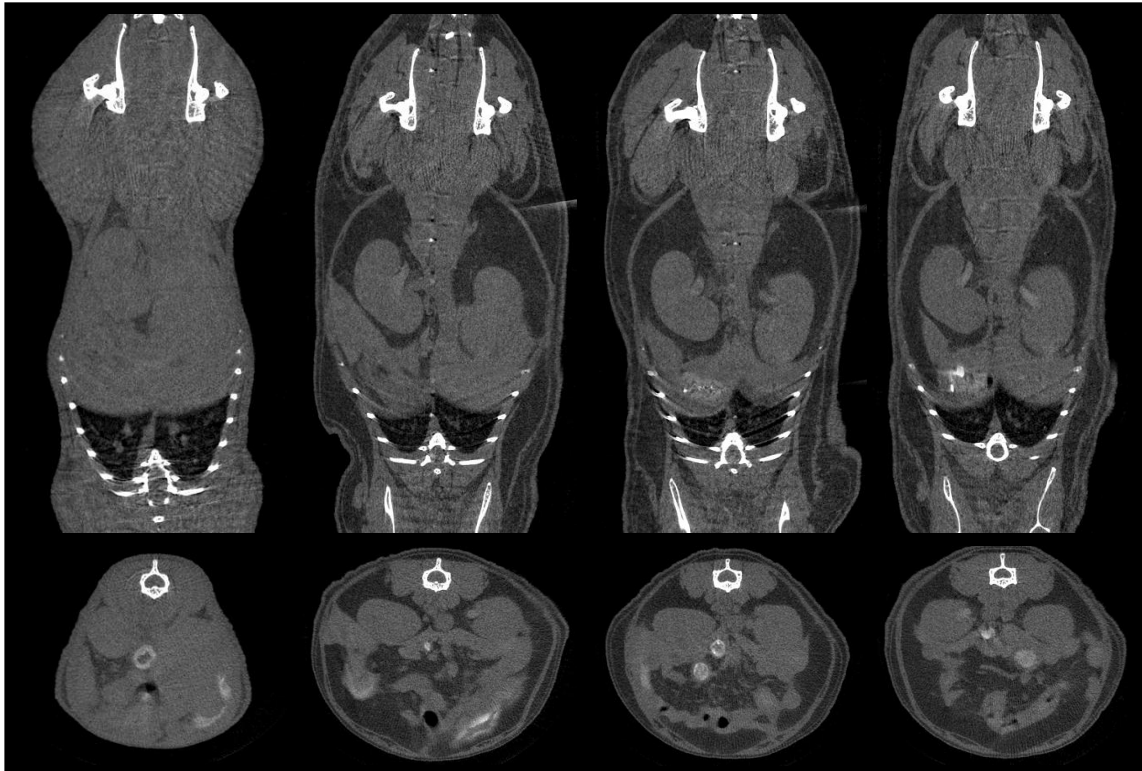
I topi alimentati con dieta standard sono stati utilizzati come nostro controllo. Quelli alimentati con dieta HFD sono stati successivamente trattati con i composti antagonisti JMV 2959 e EP 80317 o soluzione fisiologica (controllo obeso). L'effetto sul peso corporeo è stato espresso come percentuale di incremento rispetto al valore iniziale, assunto come 100%. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$ .



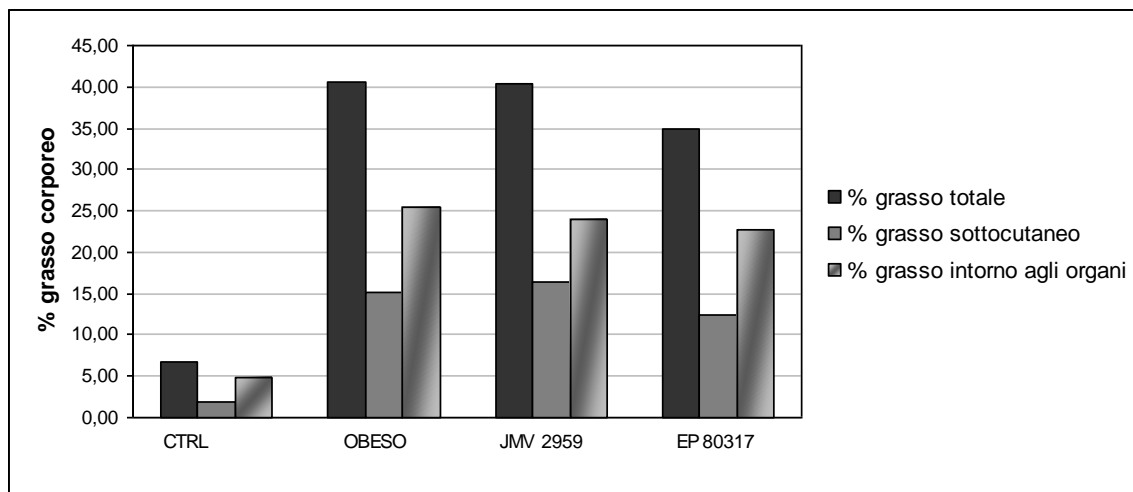
**Figura 21:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, dei composti JMV 2959 e EP 80317 sull'andamento del peso corporeo nel topo con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

I topi maschi sono stati trattati i.p., due volte al giorno (8:30 a.m. e 16:30 p.m.) con soluzione fisiologica o con i composti JMV 2959 o EP 80317 (320 µg/Kg). L'effetto sul peso corporeo è stato espresso come percentuale di incremento/decremento rispetto al valore iniziale, assunto come 100%. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

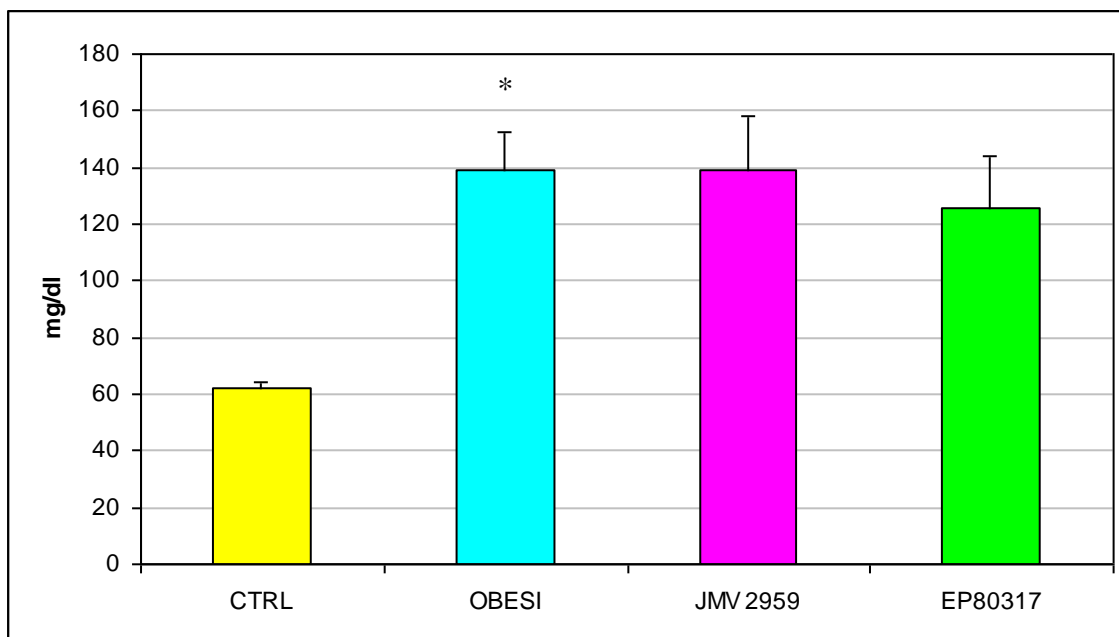
\*  $p < 0.05$  vs obesi



**Figura 22:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, dei composti JMV 2959 e EP 80317 sul grasso corporeo. Mediante analisi microtomografica computerizzata con Skyscan 1176 abbiamo quantificato la quantità di tessuto adiposo presente nei topi sottoposti ai differenti trattamenti. A: CTRL, B :OBESO, C :JMV 2959, D :EP 80317.



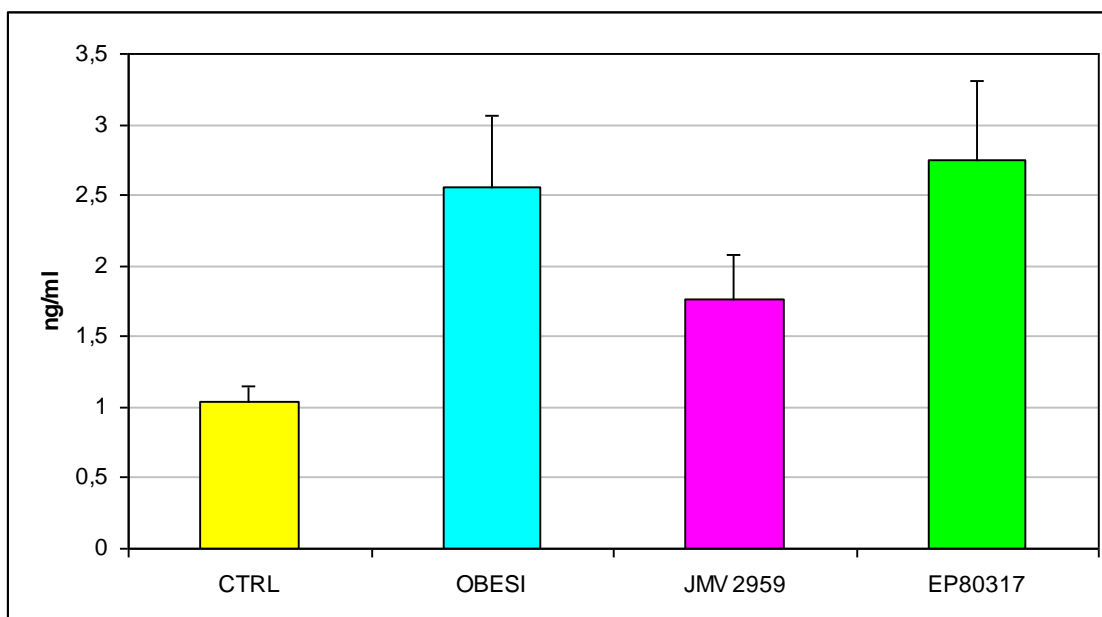
**Figura 23:** Percentuale grasso corporeo suddiviso in grasso sottocutaneo e grasso intorno agli organi.



**Figura 24:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui valori di glicemia nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

Agli animali a digiuno da 12 h è stata misurata la glicemia. I risultati (mg/dl) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale .

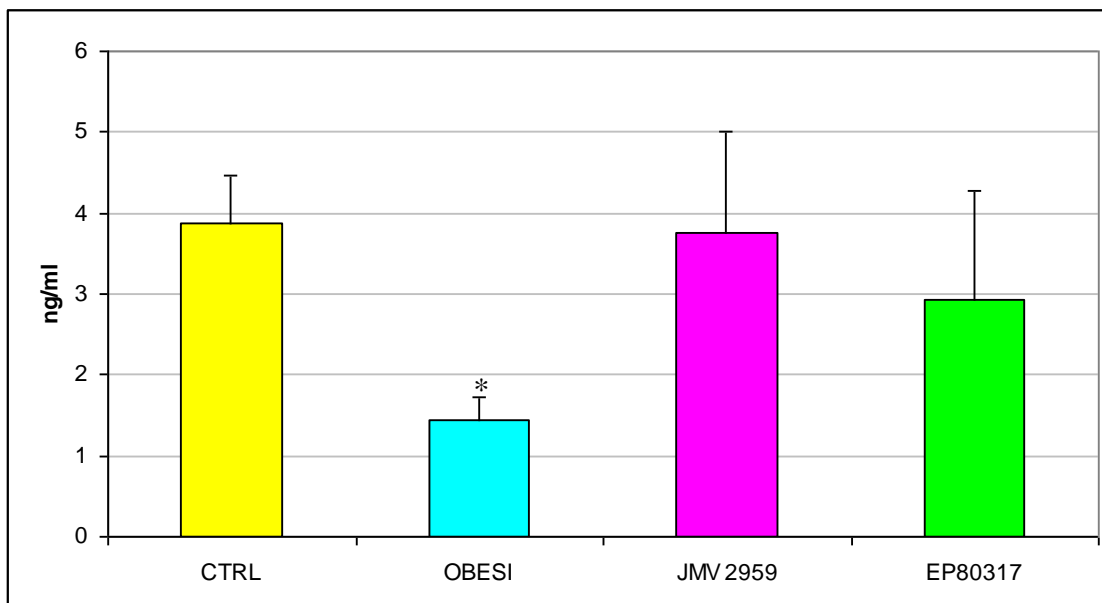
\*  $p < 0.05$  vs controllo



**Figura 25:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di composti JMV 2959 e EP 80317 sui valori di GLP-1 nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

I valori di GLP-1 sono stati misurati mediante dosaggio immunoenzimatico. I risultati (ng/ml) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale

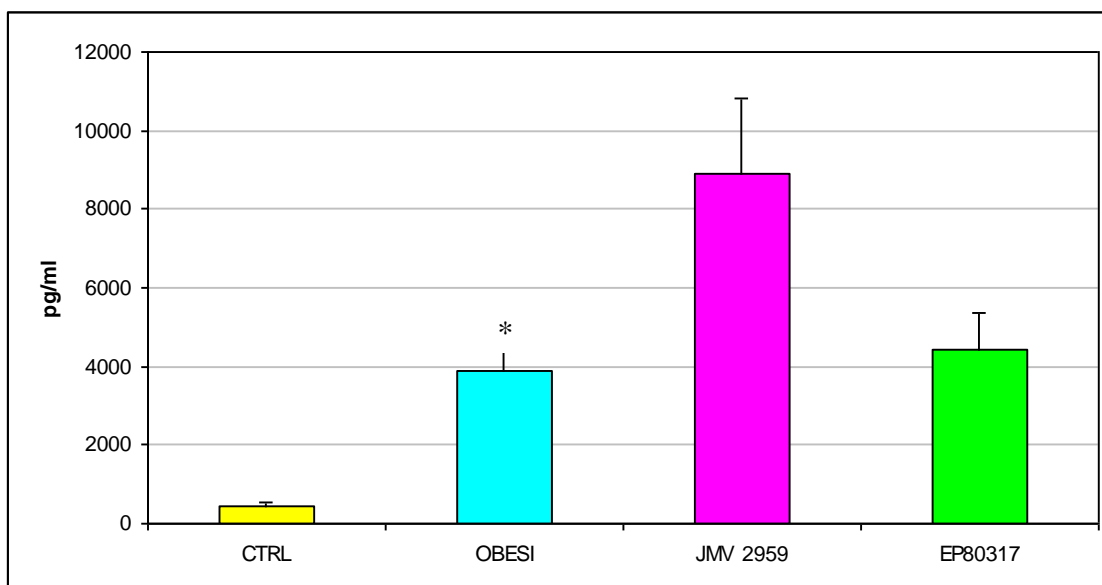




**Figura 26:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di ghrelin nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

I livelli nel plasma di ghrelin sono stati misurati mediante dosaggio immunoenzimatico. I risultati (ng/ml) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale.

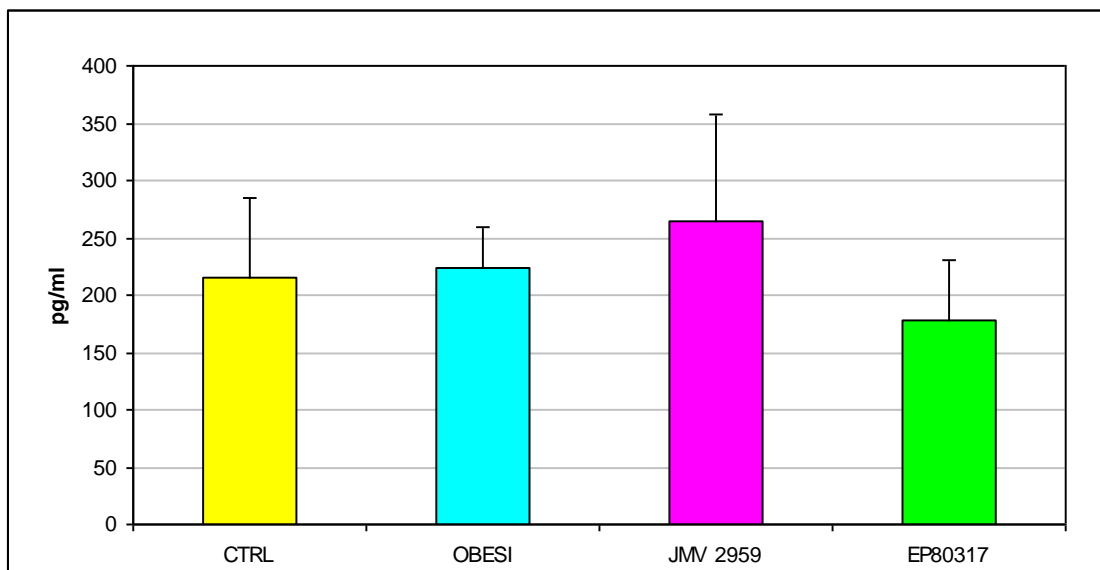
\*  $p < 0.05$  vs controllo



**Figura 27:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di leptina nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

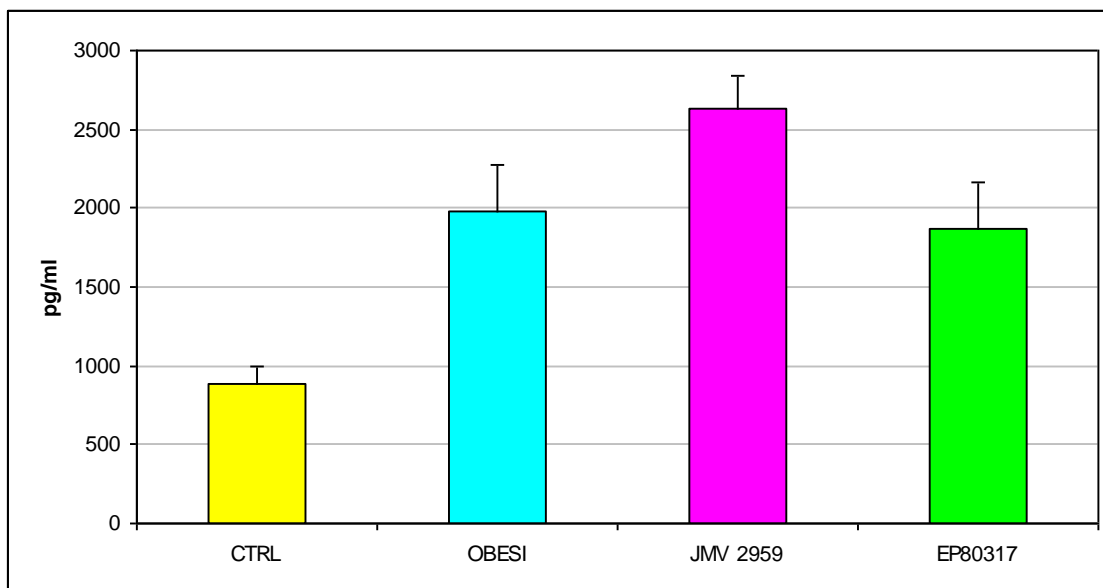
I valori di leptina sono stati misurati mediante tecnologia luminex I risultati (pg/ml) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale.

\*  $p < 0.05$  vs controllo



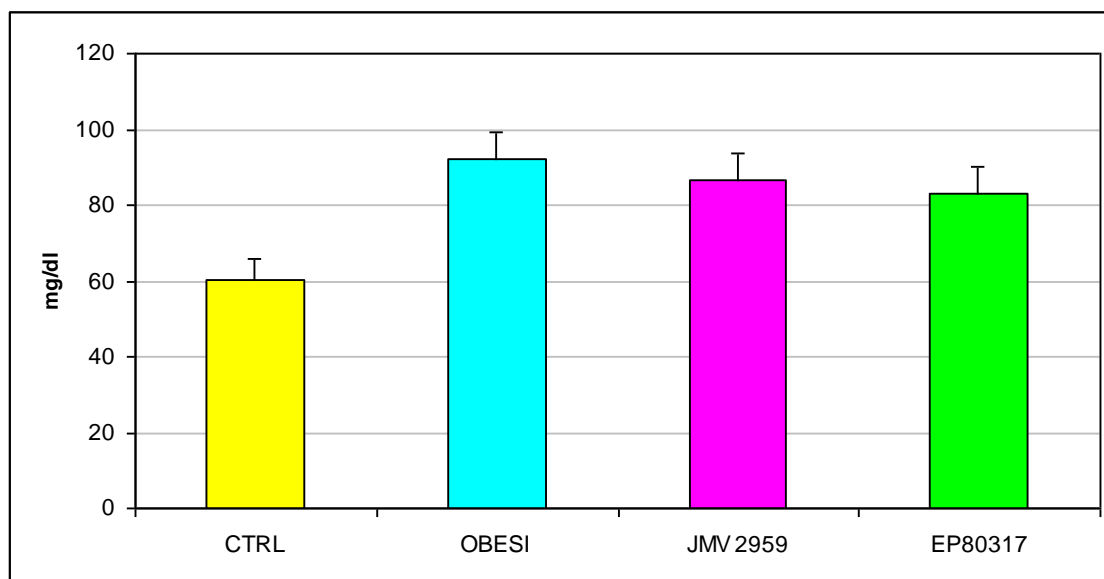
**Figura 28:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di insulina nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

I valori di insulina sono stati misurati mediante tecnologia luminex. I risultati (pg/ml) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale.



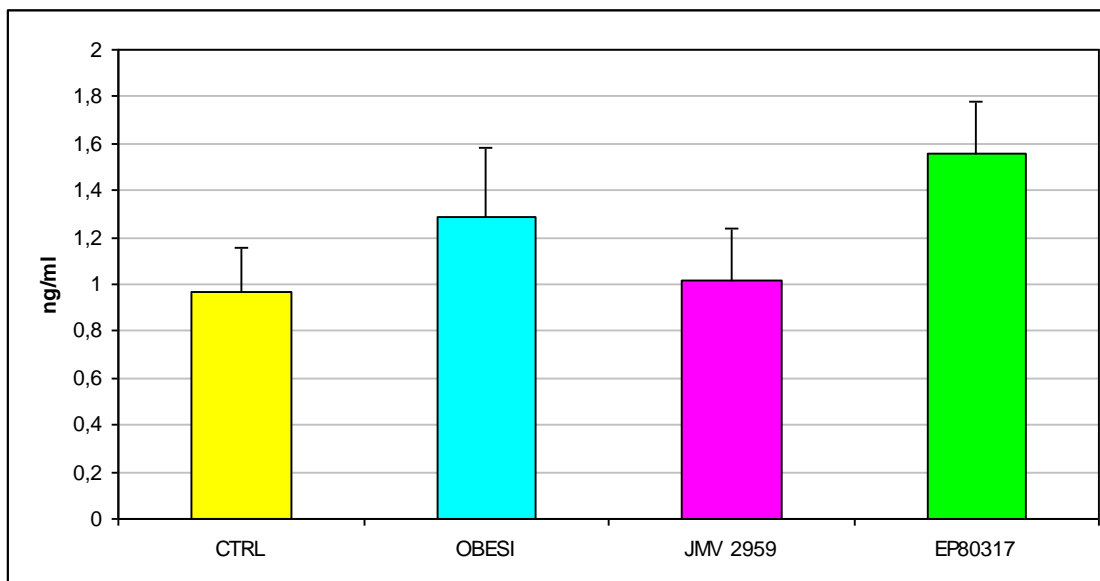
**Figura 29:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di resistina nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

I valori di resistina sono stati misurati mediante tecnologia luminex. I risultati (pg/ml) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale.



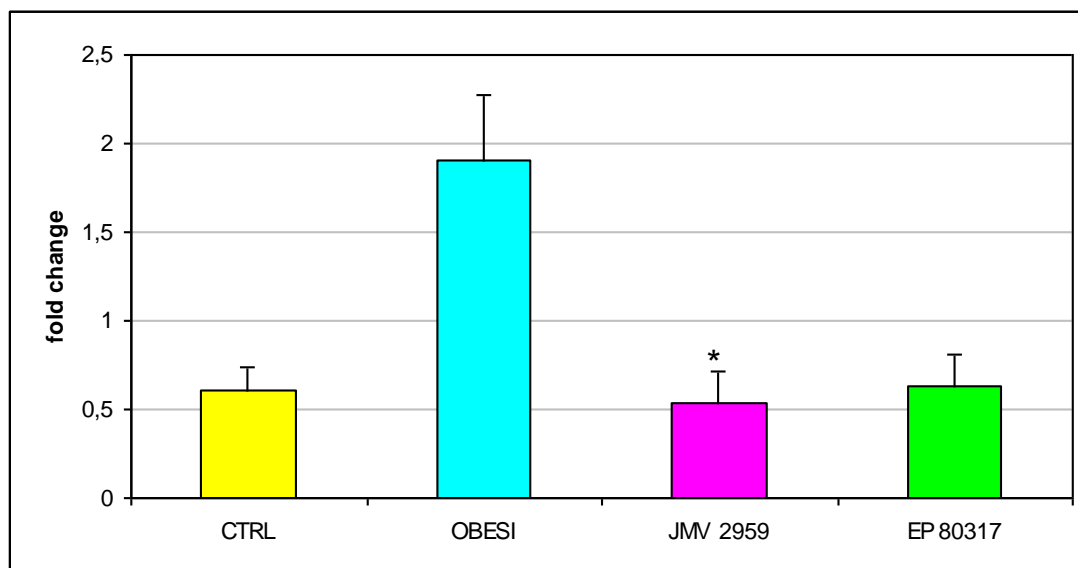
**Figura 30:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di trigliceridi nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

I valori dei trigliceridi sono stati misurati mediante saggio colorimetrico. I risultati (mg/dl) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale.



**Figura 31:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di PYY nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

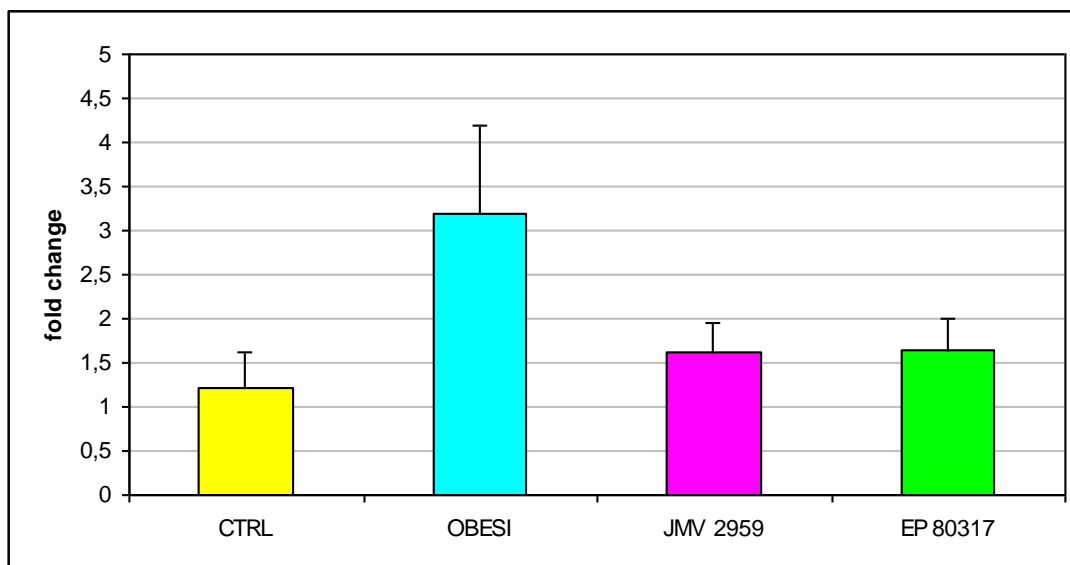
I valori di PYY sono stati misurati mediante dosaggio immunoenzimatico. I risultati (ng/ml) sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 campioni per ogni gruppo sperimentale.



**Figura 32:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di TNF- $\alpha$  nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

Questi valori sono stati ottenuti mediante Real Time PCR. Come gene housekeeping per la normalizzazione è stata utilizzata la  $\beta$ -actina. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

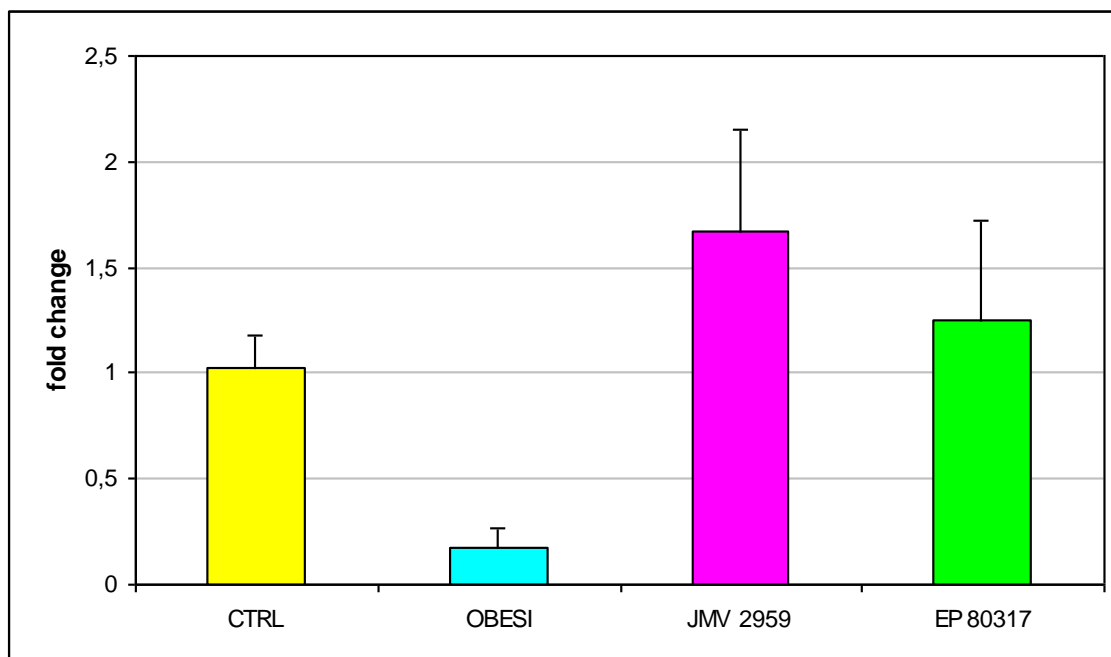
\*  $p < 0.05$  vs Obesi



**Figura 33:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di MCP-1 nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

Questi valori sono stati ottenuti mediante Real Time PCR. Come gene housekeeping per la normalizzazione è stata utilizzata la  $\beta$ -actina. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.





**Figura 34:** Effetti della somministrazione per 7 giorni, di composti JMV 2959 e EP 80317 sui livelli circolanti di lipina nel topo controllo e in quelli con obesità indotta da dieta ad alto contenuto di grassi.

Questi valori sono stati ottenuti mediante Real Time PCR. Come gene housekeeping per la normalizzazione è stata utilizzata la  $\beta$ -actina. I risultati sono espressi come  $M \pm ES$  di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

## ***Bibliografia***

**A**

Alderden et al. *The discovery and development of cisplatin. Journal of Chemical Education* 2006; **83** (5).

Adam JA, Menheere PP, van Delen FM, et al. *Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. Int J Obese Relat Metab Disord* 2002 ; **26** : 274-6.

Andersson, U., K. Filipsson, et al. *AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. J Biol Chem* 2004; **279**(13): 12005-8

Anand, B. K. and J. R. Brobeck. *Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. Proc Soc Exp Biol Med* 1951; **77**(2): 323-4.

Anini, Y. and P. L. Brubaker. *Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. Diabetes* 2003; **52**(2): 252-9

Ahima, R. S. *Leptin and the neuroendocrinology of fasting. Front Horm Res* 2000; **26**: 42-56.

Arvat, E. *Ghrelin and synthetic GH secretagogues. 2002; Best practice and research Clinical Endocrinology and Metabolism.*

Avenell, A., T. J. Brown, et al. *What interventions should we add to weight reducing diets in adults with obesity? A systematic review of randomized controlled trials of adding drug therapy, exercise, behaviour therapy or combinations of these interventions. J Hum Nutr Diet* 2004; **17**(4): 293-316.

**B**

Banterle A., Cavaliere A. *The social and economic determinants of obesity: an empirical study in Italy. Proceedings of 113th Seminar of European Association of Agricultural Economists, Chania, Crete, Greece, 03-06 September 2009, pp. 1-13.*

Batterham, R. L. and S. R. Bloom. *The gut hormone peptide YY regulates appetite." Ann N Y Acad Sci* 2003 ; **994**: 162-8.

Batterham, R. L., M. A. Cohen, et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 2003; **349**(10): 941-8.

Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, et al. Gut hormone PYY (3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002; **418**: 650-4.

Baura, G. D., D. M. Foster, et al. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain." *J Clin Invest* 1993 **92**(4): 1824-30.

Bennett, P. A., G. B. Thomas, et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 1997; **138**(11): 4552-7.

Berthoud HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14** (Suppl 5): 197S-200S.

Body JJ: The syndrome of anorexia-cachexia. *Curr Opin Oncol* 1999; **11**: 255-260.

Bowers, C. Y., F. A. Momany, et al. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984; **114**(5): 1537-45

Bray, G. A. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(6): 2583-9.

Bresciani, E., D. Rapetti, et al. Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *J Endocrinol Invest* 2006; **29**(8): RC16-8.

Broberger, C., J. Johansen, et al. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(25): 15043-8.

Bruning JC, Gautan D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; **289**: 2122-25.

Burdyga, G., A. Varro, et al. Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**(6): G1289-97.

## C

Challis, B. G., S. B. Pinnock, et al. Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse." *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **311**(4): 915-9.

Chang T., Barrett J. M., Vosti S. *The Physical, Social, and Cultural Determinants of Obesity: An Empirical Study of the U.S. Proceedings of International Association of Agricultural Economists Conferenc, 2006, Gold Coast, Australia, 12-18 August, pp. 1-16*

Chen, C., D. Wu, et al. Signal transduction systems employed by synthetic GH releasing peptides in somatotrophs." *J* 1996; **148**(3): 381-6.

Chen, C., J. Zhang, et al. Two types of voltage-dependent calcium current in rat somatotrophs are reduced by somatostatin. *J Physiol* 1990; **425**: 29-42.

Chen, H. Y., M. E. Trumbauer, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 2004; **145**(6): 2607-12.

Chua SC Jr, Chung Wk, Wu-Peng XS, et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996; **271**: 994-6.

Crawley, J. N. and R. L. Corwin. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 1994; **15**(4): 731-55.

Cummings, D. E., K. E. Foster-Schubert, et al. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets* 2005; **6**(2): 153-69.

Cummings, D. E. and J. Overduin. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 2007; **117**(1): 13-23.

Cummings, D. E., J. Q. Purnell, et al. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; **50**(8): 1714-9.

## D

Davis MP. New drugs for anorexia-cachexia syndrome. *Curr Onco Rep* 2003 ; **4** : 264-274.

De Ambroggi, M., S. Volpe, et al. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidyl hormone. *Med Sci Monit* 2003 **9**(9): RA217-24.

Deghenghi, R., Boutignon F, Luoni M, Grilli R, Guidi M & Locatelli V. Characterization of the activity of new growth hormone secretagogues in the infant rat. 1996; 10<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology.

Deghenghi, R., M. M. Cananzi, et al. GH-releasing activity of Hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats. *Life Sci* 1994; **54**(18): 1321-8

De Marchi, B., S. Casati, et al. Stakeholder appraisal of policy options for responding to obesity in Italy. *Obes Rev* 2007; **8 Suppl 2**: 83-9.

Dhillon, W. S., C. J. Small, et al. "Hypothalamic interactions between neuropeptide Y, agouti-related protein, cocaine- and amphetamine-regulated transcript and alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro in male rats." *J Neuroendocrinol* 2002; **14**(9): 725-30.

Donkor, J., M. Sariahmetoglu, et al. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* 2007 ; **282**(6): 3450-7.

Drewnowski A., Darmon N. Food choice and Diet Cost: an Economic Analysis", *The Journal of Nutrition* 2005; Vol. 135, pp. 900-904.

Drichoutis A. C., Lazaridis P., Nayga R. M. Who is looking for Nutritional Food Labels?", *Eurochoices* 2005; Vol. 4, n.1, pp. 18-23.

*Drichoutis A. C., Lazaridis P., Nayga R. M., Kapsokefalou M., Chryssochoidis G. A theoretical and empirical investigation of nutritional labels use. European Journal Health Economics 2008; Vol. 9, pp. 293-304.*

## **E**

*El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, et al. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. J Clin Invest 2000; **105**(12): 1827-32*

*Ellacott, K. L. and R. D. Cone. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. Recent Prog Horm Res 2004; **59**: 395-408*

*Evans W, Morley E, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Wolfe R, Anker S. Cachexia: a new definition. Clinical Nutrition 2008; **27**, 793-799.*

## **F**

*Fearon K, Strasser F, Anker S, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger R, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos V. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol 2011; 489-95.*

*Fernandez-Fernandez, R., A. C. Martini, et al. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. Mol Cell Endocrinol 2006; **254-255**: 127-32.*

*Fernandez-Fernandez, R., M. Tena-Sempere, et al. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. Neuroendocrinology 2005; **82**(5-6): 245-55.*

Frago L.M., Baquedano E., Argente J. and Chowen A. Neuroprotective actions of ghrelin and ghrowth hormone secretagogues. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2012; **4**(23):1-10.

## G

Garg, A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med* 2004 ; **350**(12): 1220-34.

Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience* 2009; **159** (4): 1193-9.

Ghigo, E., E. Arvat, et al. Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**(3): 693-8.

Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1973; **84**: 488-95.

Gnanapavan, S., B. Kola, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; **87**(6): 2988.

Gourcerol, G., D. H. St-Pierre, et al. Lack of obestatin effects on food intake: Should obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)? *Regul Pept* 2007.

Gourcerol, G. and Y. Tache. Obestatin - a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. *Neurogastroenterol Motil* 2007; **19**(3): 161-5.

Gualillo, O., F. Lago, et al. One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **256**(1-2): 1-8.



Guillemin, R., P. Brazeau, et al. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 1982 **218**(4572): 585-7

## H

Hahn, T. M., J. F. Breininger, et al. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1998; **1**(4): 271-2.

Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science* 1995; **269**(5223): 543-6.

Hardie, D. G., J. W. Scott, et al. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS 2003 Lett* **546**(1): 113-20.

Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 1978; **272**: 827-9.

Hellstrom PM, Geliebter A, Naslund E, et al. Peripheral and central signals in the control of eating in normal, obese and binge-eating human subjects. *Br J Nutr* 2004; **92**: S47-57.

Holst, B., N. D. Holliday, et al. Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 2004; **279**(51): 53806-17.

Holst, B. and T. W. Schwartz. Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol Sci* 2004; **25**(3): 113-7

Holdener E.E, Parr C.H., Belt R.J. Effect of mannitol and human plasma on cytotoxicity of cis-dichlorodiammineplatinum. *Clin. Res* 1978; **26**: 436A

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2000; **20** (6): 1595-9.

Howard, A. D., S. D. Feighner, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; **273**(5277): 974-7.

Huffman S. K., Rizov M. *The Rise of Obesity in Transition Economies: Theory and Evidence from the Russian Longitudinal Monitoring Survey. Proceeding of Annual Meeting of American Agricultural Economics Association 2008; Orland, FL, July, pp.1-35.*

## *J*

Jacks, T., G. Hickey, et al. *Effects of acute and repeated intravenous administration of L-692,585, a novel non-peptidyl growth hormone secretagogue, on plasma growth hormone, IGF-1, ACTH, cortisol, prolactin, insulin, and thyroxine levels in beagles. J Endocrinol 1994; 143(2): 399-406.*

## *K*

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. *Interaction appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocr Rev 1999; 20: 68-100.*

Kalra, S. P., N. Ueno, et al. *Stimulation of appetite by ghrelin is regulated by leptin restraint: peripheral and central sites of action. J Nutr 2005; 135(5): 1331-5.*

Kelland, L. *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer 2007 ; 7(8): 573-84.*

Klein, S., D. B. Allison, et al. *Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: a Consensus Statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. Obesity (Silver Spring) 2007; 15(5): 1061-7.*

Kojima, M., H. Hosoda, et al. *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999; 402(6762): 656-60.*

Kola, B., E. Hubina, et al. *Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. J Biol Chem* 2005; **280**(26): 25196-201.

Kolaczynski JW, Ohannessian JP, Considine RV, et al. *Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 4162-5.

Konturek, P. C., J. W. Konturek, et al. *Neuro-hormonal control of food intake; basic mechanisms and clinical implications. J Physiol Pharmacol* 2005; **56 Suppl 6**: 5-25.

Konturek, S. J., J. W. Konturek, et al. *Brain-gut axis and its role in the control of food intake. J Physiol Pharmacol* 2004; **55**(1 Pt 2): 137-54.

Kotz J.C., Ptreichel J., *Journal of Chemistry and Chemical Reactivity, 4th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1999.*

Koyama, S., S. Hata, et al. *Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. J Mol Biol* 2008; **376**(5): 1224-36.

Krude, H., H. Biebermann, et al. *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat Genet* 1998 **19**(2): 155-7.

Kubrak C, Olson K, Jha N, et al. *Nutrition impact symptoms: key determinants of reduced dietary intake, weight loss, and reduced functional capacity of patients with head and neck cancer before treatment. Head Neck* 2010; **32**: 290-300.

## Ł

Lakdawalla D., Philipson T. *The growth of obesity and technological change: a theoretical and empirical examination. National bureau of economic research* 2002; Working Paper 8946, pp. 1-34.

Langner, C. A., E. H. Birkenmeier, et al. *Characterization of the peripheral neuropathy in neonatal and adult mice that are homozygous for the fatty liver dystrophy (fld) mutation. J Biol Chem* 1991 ; **266**(18): 11955-64.

Lean, M. E. How does sibutramine work? *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25 Suppl 4**: S8-11.

Lecker, S. H. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; **6(3)**: 271-5.

Lelli G, Montanari M, Gilli G, et al. Treatment of anorexia-cachexia syndrome: a critical reappraisal. *J Chemoter* 2003; **15**: 220-225.

Lengyel, A. M. Novel mechanisms of growth hormone regulation: growth hormone-releasing peptides and ghrelin. *Braz J Med Biol Res.* 2006; **39**: 1003-11.

Lopez, M., S. Tovar, et al. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 2007 ; **66(1)**: 131-55.

Luquet, S., C. T. Phillips, et al. "NPY/AgRP neurons are not essential for feeding responses to glucoprivation. *Peptides* 2007; **28(2)**: 214-25.

## **M**

Maffei, M., J. Halaas, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; **1(11)**: 1155-61.

Marsh, D. J., D. T. Weingarth, et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99(5)**: 3240-5.

Mazzocchi M. *Nutrizione, salute e interventi di politica economica in Europa. Agriregionieuropa* 2005; anno1, n.1.

Mazzocchi M., Traill W. B., Shogren. *Fat Economics, Oxford University Press* 2009.

McDowell, R. S., K. A. Elias, et al. Growth hormone secretagogues: characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92(24)**: 11165-9.

Miljkovic D., Nganje W., de Chastenet H. Economic factors affecting the increase in obesity in the United States: Differential response to price. *Food Policy* 2008; Vol. 33, n. 1, pp. 48-60.

Millburn G.H.W., Turter M.R., *J. Chem. Soc (A)*, 1966; 1609.

Minokoshi, Y., T. Alquier, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; **428**(6982): 569-74.

Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 2000; **16**: 858-65.

Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; **443**(7109): 289-95.

Muccioli, G., A. Baragli, et al. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology* 2007; **86**(3): 147-64.

## N

Nagaya, N., M. Kojima, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia. *Intern Med* 2006.

Naslund E, Bogefors J, Scogard S, et al. GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon and PYY release in humans. *Am J Physiol* 1999; **277**: R910-6.

Naslund E, Barkeling B, King N, et al. Energy intake and appetite are suppressed by glucagonlike-peptide1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23**: 304-11.

Naslund, E., N. King, et al. Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *Br J Nutr* 2004; **91**(3): 439-46.

Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol* 2004; **60**: 153-60.

Nestler, E.J., Hyrnan, E.S., Singh, J. and Malenka, R.C. Gordon, K.G., Bedell, J. and Reed. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*, New York 2001 McGraw-Hill.

Nisoli, E. and M. O. Carruba. A benefit-risk assessment of sibutramine in the management of obesity. *Drug Saf* 2003; **26**(14): 1027-48.

Nishi Y., Yoh J., Hiejima H., Kojima M. Structures and molecular forms of ghrelin-family peptides. *Peptides* 2011; **32**: 2175-2182.

Nogueiras, R., P. Pfluger, et al. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 2007; **148**(1): 21-6.

## O

Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 2002; **8**: 1376-82.

Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*.1954; **47** (6):419-27.

Orskov C. Glucagon-like peptide- 1, a new hormone of the entero-insulin axis. *Diabetology* 1992; **35**: 701-711.

## P

Padwal, R., S. K. Li, et al. Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. 2003; *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD004094.

Padwal, R. S. and S. R. Majumdar. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet* 2007; **369**(9555): 71-7.

Patchett, A. A., R. P. Nargund, et al. Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(15): 7001-5.

Patton T.F., Himmelstein K.j. Plasma levels and urinary excretion of filterable platinum species following bolus injection and i.v. infusion of cis-diamminedichloroo platinum (II) in man. *Cancer Treat. Rep.*1978; **62**: 1359-1362.

Peterfy, M., J. Phan, et al. Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J Biol Chem* 2005; **280**(38): 32883-9.

Peterfy, M., J. Phan, et al. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 2001; **27**(1): 121-4.

Pettersson I, Muccioli G, Granata R, Deghenghi R, Ghigo E, Ohlsson C, Isgaard J. Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *J Endocrinol.* 2002 ; Oct; **175**(1):201-9.

Peyrone M.M, *Ann. Chim. Phys.*, 1844, **3**, 193.

Phan, J., M. Peterfy, et al. Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 2004 ; **279**(28): 29558-64.

Pil P., Lippard S.J., in: J.R.Bertino (Ed.), *Enciclopedia of Cancer*, Vol.1, Academic Press, San Diego, 1997; p.392.

Pinto A.L and Lippard S.J. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum-II (cisplatin) to DNA. *Biochem Biophys Acta* 1985; **780**: 167-80.

Pironi, L., V. Stanghellini, et al. Fat-induced ileal brake in humans: a dose-dependent phenomenon correlated to the plasma levels of peptide YY. *Gastroenterology* 1993; **105**(3): 733-9.

Pi-Sunyer, F. X., L. J. Aronne, et al. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *Jama* 2006; **295**(7): 761-75.

Pliquett RU, Fuhrer D, Falk S et al. The effects of insulin on the central nervous system--focus on appetite regulation. *Horm Metab Res* 2006 ; **38** : 442-6.

Popovic, V., D. Miljic, et al. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; **88**(7): 3450-3.

Porte, D., Jr., D. G. Baskin, et al. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 2002; **60**(10 Pt 2): S20-9; discussion S68-84, 85-7.

Purnell, J. Q., D. Cummings, et al. Changes in 24-h area-under-the-curve ghrelin values following diet-induced weight loss are associated with loss of fat-free mass, but not with changes in fat mass, insulin levels or insulin sensitivity. *Int J Obes* 2007 (Lond) **31**(2): 385-9.

## Q

Qu, D., D. S. Ludwig, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996; **380**(6571): 243-7.

## R

Reue, K., P. Xu, et al. Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (*fld*) gene. *J Lipid Res* 2000 ; **41**(7): 1067-76.

Ryden, M. and P. Arner. Fat loss in cachexia--is there a role for adipocyte lipolysis? *Clin Nut* 2007; **26**(1): 1-6.



Roberts J.J. Mechanism of antitumourplatinum compounds. *Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia*. C. Chagas & B.Pullman (Eds). Vol 70, p463.

Rolls, B. J., P. M. Van Duijvenvoorde, et al. Variety in the diet enhances intake in a meal and contributes to the development of obesity in the rat. *Physiol Behav* 1983 **31**(1): 21-7.

Rolls, E. T. Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol Behav* 2005; **85**(1): 45-56.

Rolls, E. T. Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; **361**(1471): 1123-36.

Rolls, E. T. Understanding the mechanisms of food intake and obesity. *Obes Rev* 2007; **8** Suppl 1: 67-72.

Rosenberg B., in: B.Lippert (Ed.), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH, Zurich, 1999, p.3.

Rosenberg B., Camp L.V., Krigas T., *Nature* 1965, **205**, 698.

Rosenberg B, *Fundamental studies with cisplatin. Cancer* 1985; **55**: 2303-16.

Rossi, M., M. S. Kim, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998; **139**(10): 4428-31.

## S

Schellekens H., Finger B. C., Dinan T. G., Cryan J. F. Ghrelin signalling and obesity: at the interface of stress, mood and food reward. *Pharmacology & Therapeutics* 2012; **135**(3):316-26.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26746-9.

Schwartz MW, Bergam RN, Kahn SE, et al. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspect and implications for transport. *J Clin Invest.* 1991; **88**: 1272-81.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Bastik DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; **404**: 661-671.

Sobhani I, Buyse M, Goiot et al. Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. *Gastroenterology* 2002; **122**: 259-63.

Societa Italiana di Chirurgia dell'Obesita e delle malattie metaboliche. Linee guida e stato dell'arte della chirurgia bariatrica e metabolica in Italia. *SICOB* 2006.

Speakman, J. R. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr* 2004; **134**(8 Suppl): 2090S-2105S.

Stanley, S., K. Wynne, et al. "Hormonal regulation of food intake." *Physiol Rev* 2005; **85**(4): 1131-58.

Strader, A. D. and S. C. Woods. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005 **128**(1): 175-91

Sun, Y., P. Wang, et al. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(13): 4679-84.

Swart, I., J. W. Jahng, et al. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; **283**(5): R1020-6.

## **T**

Teintelbaurn P and Stellar E. Recovery from the failure to eat, produced by hypothalamic lesions. *Science.* 1954 Nov 26; **120** (3126).894-895.

Tschop, M., D. L. Smiley, et al. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; **407**(6806): 908-13.

Tschop, M., R. Wawarta, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; **24**(6): RC19-21.

Tassone, F., F. Broglio, et al. Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**(11): 5478-83

Torsello, A., V. Locatelli, et al. Differential orexigenic effects of hexarelin and its analogs in the rat hypothalamus: indication for multiple growth hormone secretagogue receptor subtypes. *Neuroendocrinology* 2000; **72**(6): 327-32.

Torsello, A., M. Luoni, et al. Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. *Eur J Pharmacol* 1998 **360**(2-3): 123-9.

Toshinai, K., Y. Date, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003; **144**(4): 1506-12.

Tschop, M., D. L. Smiley, et al. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; **407**(6806): 908-13.

Tschop, M., R. Wawarta, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels." *J Endocrinol Invest* 2001; **24**(6): RC19-21.

Turton, M. D., D. O'Shea, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996; **379**(6560): 69-72.

V

Van Gaal, L. F., A. M. Rissanen, et al. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005 **365**(9468): 1389-97.

Variyam J. N. Do nutrition labels improve dietary outcomes?. *Health Economics* 2008; Vol. 17, pp. 1-14.

## W

Walker, R. F., E. E. Codd, et al. Oral activity of the growth hormone releasing peptide His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> in rats, dogs and monkeys. *Life Sci* 1990 **47**(1): 29-36.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet* 2001 ; 357 (9253) :354-7

Werner A., *Neutre Anschuungen auf dem Gebeite der Anorganische Chemie*, Druck und Verlag von Friedich Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1905.

Wilding JP. Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med* 2002; **19**: 619-27.

Wilding, J. P. Treatment strategies for obesity. *Obes Rev* 2007 **8 Suppl 1**: 137-44.

Woods SC, Lotter EC, Mckay LD, Porte D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979; **282**:503-5.

Wortley, K. E., J. P. del Rincon, et al. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity." *J Clin Inves* t2005; **115**(12): 3573-8.

Wren, A. M., L. J. Seal, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(12): 5992

Wynne, K., S. Stanley, et al. Appetite control. *J Endocrinol* 2005; **184**(2): 291-318

Wu, D., C. Chen, et al. (1994). "The effect of GH-releasing peptide-2 (GHRP-2 or KP 102) on GH secretion from primary cultured ovine pituitary cells can be abolished by a specific GH-releasing factor (GRF) receptor antagonist." *J Endocrinol* **140**(2): R9-13.

---

Wu, D., C. Chen, et al. (1994). "Effects in vitro of new growth hormone releasing peptide (GHRP-1) on growth hormone secretion from ovine pituitary cells in primary culture." *J Neuroendocrinol* **6**(2): 185-90.

## X

Xue, B. and B. B. Kahn. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol* 2006; **574**(Pt 1): 73-83.

## Y

Yamamoto, D., N. Ikeshita, et al. Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept* 2007; **138**(2-3): 141-4.

Yamamoto, D., N. Ikeshita, et al. GHRP-2, a GHS-R agonist, directly acts on myocytes to attenuate the dexamethasone-induced expressions of muscle-specific ubiquitin ligases, Atrogin-1 and MuRF1. *Life Sci* 2008; **82**(9-10): 460-6.

## Z

Zhang, J. V., P. G. Ren, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; **310**(5750): 996-9.

Zhang, M., C. Balmadrid, et al. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. *Behav Neurosci* 2003; **117**(2): 202-11.

Zizzari, P., R. Longchamps, et al. Obestatin Partially Affects Ghrelin Stimulation Of Food Intake And Gh Secretion In Rodents. *Endocrinology* 2007

**ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS**

Jan 08, 2013

*This is a License Agreement between laura rizzi ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.*

*Supplier Elsevier Limited  
The Boulevard, Langford Lane  
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK  
Registered Company  
Number  
1982084*

*Customer name laura rizzi  
Customer address via cadore 48  
monza, 20900*

*License number 3064100075155  
License date Jan 08, 2013  
Licensed content publisher Elsevier  
Licensed content publication Peptides  
Licensed content title **Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides**  
Licensed content author Yoshihiro Nishi, Junko Yoh, Hiroshi Hiejima, Masayasu Kojima  
Licensed content date November 2011  
Licensed content volume number 32  
Licensed content issue number 11  
Number of pages 8  
Start Page 2175  
End Page 2182  
Type of Use reuse in a thesis/dissertation  
Number of figures/tables/illustrations 1  
Format both print and electronic  
Are you the author of this Elsevier article? No  
Will you be translating? No*

*Title of your thesis/dissertation  
IDENTIFICAZIONE DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE PER IL CONTROLLO  
DELL'OBESITA' E DELLA CACHESSIA MEDIANTE UTILIZZO DI NUOVI COMPOSTI  
PEPTIDOMIMETICI DOTATI DI ATTIVITA' ANTAGONISTA O AGONISTA DELL'ORMONE  
PEPTIDICO ENDOGENO GHRELIN  
Expected completion date Feb 2013  
Estimated size (number of Elsevier VAT number) GB 494 6272 12*

**ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS**

Jan 08, 2013

*This is a License Agreement between laura rizzi ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.*

*Supplier Elsevier Limited  
The Boulevard, Langford Lane  
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK  
Registered Company  
Number  
1982084*

*Customer name laura rizzi  
Customer address via cadore 48  
monza, 20900*

*License number 3064091224037  
License date Jan 08, 2013  
Licensed content publisher Elsevier  
Licensed content publication Pharmacology & Therapeutics  
Licensed content title **Ghrelin signalling and obesity: At the interface of stress, mood and food reward**  
Licensed content author Harriët Schellekens, Beate C. Finger, Timothy G. Dinan, John F. Cryan  
Licensed content date September 2012  
Licensed content volume number 135  
Licensed content issue number 3  
Number of pages 11  
Start Page 316  
End Page 326  
Type of Use reuse in a thesis/dissertation  
Number of figures/tables/illustrations 2  
Format both print and electronic  
Are you the author of this Elsevier article? No  
Will you be translating? No*

*Title of your thesis/dissertation  
IDENTIFICAZIONE DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE PER IL CONTROLLO DELL'OBESITA' E DELLA CACHESSIA MEDIANTE UTILIZZO DI NUOVI COMPOSTI PEPTIDOMIMETICI DOTATI DI ATTIVITA' ANTAGONISTA O AGONISTA DELL'ORMONE PEPTIDICO ENDOGENO GHRELIN  
Expected completion date Feb 2013  
Estimated size (number of Elsevier VAT number) GB 494 6272 12*



Copyright  
Clearance  
Center

RightsLink®

***The Discovery and Development of Cisplatin***

*Author: Rebecca A. Alderden, Matthew D. Hall, and Trevor W. Hambley*

*Publication: Journal of Chemical Education*

*Publisher: American Chemical Society*

*Date: May 1, 2006*

*Copyright © 2006, American Chemical Society*

*Logged in as: laura rizzi*

*Account #: 3000609646*

***PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE***

*This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order.*

*Please note the following:*

*Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations. If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part. Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.*



## *Ringraziamenti*

*Eccomi qui a scrivere la pagina più personale della tesi... pagina che sarà letta sicuramente a chi capiterà in mano questa tomo, non per chissà quale motivo, ma perché la più comprensibile a chi non ha frequentato il mio corso di laurea.*

*Pagina che rileggendola farà ripercorrere nella mente il passare degli anni e farà riaffiorare infiniti aneddoti e ricordi vissuti con colleghe e...farà cadere una lacrimuccia.*

*Credo che al giorno d'oggi sia una vera fortuna svegliarsi e sorridere pensando alla giornata che sta per nascere...beh questo non dipende solo dal mio carattere e dalla mia voglia di sperimentare ed imparare ma soprattutto dall'ambiente in cui ho la fortuna di lavorare.*

*Fin da subito, quando iniziai nel novembre 2007, capii di essere arrivata in una 'seconda casa' e giorno dopo giorno con il passare degli anni ne ho sempre più la conferma. E' inevitabile ringraziare Antonio sempre disponibile, con il suo senso paterno, ad ogni chiarimento. Quante volte passando per il corridoio solo intravedendoti e sentendoti ti ho chiamato e a volte sbuffando, a volte no, ti sei affacciato alla porta dicendo 'Non ci sono!'. La tua presenza è indispensabile al fianco della professionalità del Professor Locatelli, il nostro capo di laboratorio, ininterrottamente impegnato ma comunque partecipe con la sua attenzione e scrupolosità che lo contraddistinguono. Che dire invece della nostra capa di laboratorio? Elena, una persona tre differenti 'figure': come capa per insegnarmi la sua esperienza, come amica per raccontare e condividere emozioni, come mamma quando ovviamente in alcune situazioni non può non avere la visione tipica delle mamme! E come avrei fatto senza Monica?! Fin all'ultimo pronta ad assistermi quando la pazienza mi abbandonava e sempre disponibile per ogni domanda. Quando non sapevo e non trovavo qualcosa...8229 Monik?! E poi, nel momento che mi abbandona per andarsene dall'altra parte del mondo la mia compagna di colazioni, di aperitivi, di viaggi...ma non solo...chi resta a tenermi compagnia? Laubuondi: 'Mia segretaria-assistente-amica', grazie a lei ogni scadenza, ogni ordine e quant'altro non rischiava di esser dimenticato. E poi prima ancora di sentirci sole arrivano altre due ragazze e poi un ragazzo e poi una studentessa di Medicina: Anna, Daniela, Federico e Lia. Arrivano in coppia volenterosi di lavorare, anche troppo, con il giusto entusiasmo per imparare.*

*E ora un pensiero, il primo forse per importanza, per i miei genitori, senza i quali non sarei potuta arrivare a questo punto; non parlo solo del sostegno economico che sicuramente è stato indispensabile per intraprendere questo percorso, ma di quell'aiuto tacito o a volte esplicito venuto dal loro cuore. Mi riferisco a tutte le occasioni in cui la mia mammy mi ha incoraggiata e alla sua costanza con cui ogni giorno mi prepara con lo stesso amore la schiscetta e ripenso a tutte le volte che il mio papy si è alzato presto al mattino, dopo una notte nevosa, per permettermi di uscire con la macchina. Potrei descrivere tanti altri momenti come questi ma non c'è ne è bisogno...non si vede bene che col cuore. L'essenziale è invisibile agli occhi'.*

*Un grazie anche alla zia Mary, sempre presente e disponibile in ogni circostanza. E come non ringraziare tutti gli amici che hanno riempito di emozioni questi anni! A volte mi son sentita chiamare 'Lucignolo Bellavita' perchè chi non lavora nel nostro ambito crede che noi 'dottorandi-ricercatori' non facciamo granchè! Ma non sanno quanto impegno e dedizione servono e soprattutto quanta passione ed interesse ci mettiamo in quello che facciamo!*

*Sperando ed augurandomi di poter continuare ad essere Lucignolo Bellavita...GRAZIE a tutti!*

*Mi scuso con chi... leggendo questa pagina, può non aver compreso ogni riferimento.*