



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

NEUROSCIENZE

Ciclo XXIII

**Caratterizzazione farmacologica
di un nuovo composto CB1 antagonista
con proprietà anti-obesità**

Area 05 Scienze Biologiche - BIO/14 FARMACOLOGIA

Presentata da: Ilaria Manca

Coordinatore del Dottorato: Prof. Alessandra Concas

Relatore: Prof. Giovanni Biggio

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

Indice

1. Introduzione	3
1.1 Obesità	3
1.2 Circuito fame/sazietà	5
1.3 Circuito gratificazione/piacere	8
1.4 Cannabinoidi e obesità	10
2. Obiettivi	13
3. Sintesi	14
4. Caratterizzazione <i>ex vivo</i> ed <i>in vitro</i> di un nuovo composto di sintesi CB1 antagonista: NESS038C6	17
4.1 Binding recettoriale	17
4.2 Studi di tossicità <i>in vitro</i>	19
4.3 Misurazione della temperatura corporea	20
4.4 Analisi Western Blotting	22
5. Caratterizzazione <i>in vivo</i> dell'effetto anoressizzante del composto di nuova sintesi NESS038C6	25
5.1 Trattamento acuto	25
5.2 Trattamento cronico	26
-Estrazione dell' RNA	27
-RT-PCR	28
-PCR quantitativa	28
-Parametri ematici	28
-Statistica	29
5.2.a Valutazione del comportamento alimentare	29
5.2.b Valutazione dell'espressione genica dei marcatori molecolari coinvolti nei circuiti fame/sazietà	32
5.2.c Valutazione dell'espressione genica dei marcatori molecolari coinvolti nei circuiti gratificazione/piacere	35
5.2.d Valutazione dei dati emato-chimici	43
6. Discussione e conclusioni	45
7. Referenze bibliografiche	50

1. Introduzione

1.1 Obesità

L'obesità è una condizione caratterizzata da un'alterazione del bilancio energetico ed un accumulo eccessivo di tessuto adiposo nell'organismo e rappresenta, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, uno dei principali problemi di salute pubblica nel mondo. L'obesità non implica solo un malessere estetico ma anche una serie di conseguenze per il benessere dell'organismo (Sargent e Moore, 2009). E' infatti associata ad un aumento della mortalità e a una maggiore incidenza di patologie quali diabete, cardiopatie, ipertensione, osteoartriti, disfunzioni renali e cancro (Field et al., 2009; WHO, 2002). L'obesità addominale e l'insulino-resistenza rappresentano uno dei maggiori fattori di rischio per l'insorgenza della cosiddetta "sindrome metabolica", caratterizzata dalla coesistenza di dislipidemia, alterazioni del metabolismo dei carboidrati, ipertensione e incremento dei processi infiammatori e trombotici, che portano ad un aumento dell'incidenza di disturbi cardiovascolari e ad una morte prematura (Alberti et al., 2006; Unger, 2003). Inoltre, l'obesità spesso coesiste con la depressione e può stravolgere completamente la vita di una persona: chi è obeso spesso viene isolato e deriso, il che rende difficile qualunque tipo di socialità (Fabricatore et al., 2006). Per molti obesi, una cattiva salute va inoltre di pari passo con modeste prospettive occupazionali. I datori di lavoro preferiscono candidati non-obesi a candidati obesi perchè si attendono una maggiore produttività. Questo contribuisce a creare un netto divario tra obesi e non-obesi nei tassi di occupazione e nelle retribuzioni.

Nel mondo occidentale l'obesità può essere ormai considerata una malattia cronica a diffusione crescente. I bambini con almeno un genitore obeso hanno una probabilità 3-4 volte maggiore di essere obesi. La causa è in parte genetica, ma i bambini acquisiscono gli stili di vita dei genitori (dieta poco salutare e vita sedentaria) e questo ha giocato un ruolo fondamentale nell'attuale epidemia di obesità. La patogenesi dell'obesità nell'uomo è complessa e multifattoriale, in quanto attribuibile a fattori ambientali, genetici, storici, politici, socio-economici, psicosociali e culturali (Wanderley e Ferreira, 2010; Fabricatore et al., 2006; Schwartz, 2006; Schwartz et al., 2000). Per questa ragione, purtroppo, in una elevata percentuale di pazienti obesi, una riduzione dell'apporto calorico e l'esercizio fisico non sono sufficienti a riportare il peso corporeo a livelli ottimali o a garantire un miglioramento delle alterazioni metaboliche.

Oltre a peggiorare la qualità e la quantità della vita, le malattie obesità-correlate incidono fortemente sulla spesa pubblica comportando cure, esami, ricoveri, assistenza sociale. Il

rapporto OCSE “Obesity and the economics of prevention: fit not fat” discusso a Parigi il 7-8 ottobre 2010 dai Ministri della Salute dei Paesi OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico - Organization for economic co-operation and development, Oecd) analizza, in collaborazione con l’OMS, l’impatto economico e sanitario di diversi interventi per la prevenzione dell’obesità in 5 Paesi OCSE. Secondo il rapporto, rispetto al 1980 il tasso di obesità nei Paesi dello studio è salito del 10%, in alcuni casi è raddoppiato o triplicato, mentre circa la metà della popolazione è oggi in sovrappeso. L’obesità è costosa e rappresenta un grosso fardello per la società: una persona obesa costa infatti al sistema sanitario il 25% in più di una persona con un peso nella norma, e i costi crescono in maniera esponenziale con l’aumentare dei chili di troppo. Tuttavia, a causa della ridotta aspettativa di vita, gli obesi costano meno al servizio sanitario nel corso dell’intera vita rispetto alle persone di peso normale, ma più dei fumatori. Nella maggior parte dei paesi OCSE, l’obesità è responsabile di circa l’1-3% della spesa sanitaria totale (5-10% negli Stati Uniti). Con l’aumento delle malattie legate all’obesità, i costi sono destinati a salire rapidamente nei prossimi anni. La prevenzione rimane una soluzione efficace: coprendo diverse fasce di età e i vari gruppi a rischio, si potrebbe garantire un guadagno di salute importante a prezzi contenuti. Una strategia simile in Italia costerebbe al Paese circa 17 euro a persona, una quota che potrebbe salvare circa 75 mila vite ogni anno.

I trattamenti farmacologici finora commercializzati per il trattamento dell’obesità si sono mostrati validi ma non privi di gravi effetti collaterali a livello centrale, e al momento la chirurgia, nonostante i rischi legati all’intervento, è l’unico trattamento in grado di ridurre la mortalità negli obesi gravi (Field et al., 2009). Diventa pertanto utile ricorrere allo sviluppo di nuovi farmaci, privi di effetti collaterali a livello psichiatrico, che agiscano a livello dei sistemi centrali e periferici maggiormente implicati nella regolazione del bilancio energetico (Lazzari et al., 2010; Kushner, 2007).

L’omeostasi energetica è mantenuta da un sistema complesso di segnali afferenti ed efferenti. I segnali di adiposità e di sazietà prodotti dal sistema gastroenterico e dalle cellule adipose, giungono attraverso il circolo ai centri cerebrali (prevalentemente l’ipotalamo, il tronco cerebrale e centri del “reward”) che, attraverso il signaling mediato da diversi neuropeptidi, regolano l’assunzione di cibo e il dispendio energetico in modo da mantenere un peso prefissato. In particolare, il bisogno di cibo è regolato da due centrali operative cerebrali: il “centro della fame” nell’ipotalamo laterale e il “centro della sazietà” nell’ipotalamo mediale (Morton et al., 2003; Schwartz et al., 2000).

1.2 Circuito fame/sazietà

La regolazione dell'appetito è il risultato di un fine bilancio derivante dall'azione di diversi neurotrasmettitori, che agiscono senza la necessità di un impegno cosciente da parte dell'uomo. Il desiderio di mangiare e la sensazione di sazietà che deriva dall'aver consumato un pasto abbondante sono aspetti del comportamento semplici e naturali ma che, in certe situazioni estreme, possono degenerare in malattie gravi. 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 perché 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, psicologiche e familiari, che identificano il cibo con il piacere. L'atto "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. La sensazione di pienezza gastrica permette di interrompere il pasto in uno stadio di preassorbimento e compare 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 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. 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 vari, e si ammette l'esistenza di un sistema di regolazione altamente sofisticato, localizzato nel cervello (prevalentemente nell'ipotalamo), in grado di confrontare il peso corporeo ideale con il peso reale. 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 "Sazietà Center". Il "Feeding center" è costituito dal nucleo dell'ipotalamo laterale (LHA) e la sua

eliminazione causa l'anoressia. Il "Saziety center" è costituito dal nucleo ventromediale (VMN) e dal 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, e che rispondono anche sulla base della loro recettività verso tali stimoli. Esisterebbe in altre parole 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 simil-bombesina), intestinale (colecistochinina), pancreatica (glucagone, insulina, amylna), fattori neurogenetici, 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 arrivano, attraversando la barriera emato-encefalica tramite carries specifici, i diversi segnali, i quali vengono integrati tra loro originando una risposta che sarà poi inviata ai neuroni secondari. Il nucleo arcuato è costituito da 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. I segnali afferenti possono essere classificati in segnali di sazietà e segnali di appetito. Tra i segnali di appetito troviamo la grelina, 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. Tra i segnali di sazietà abbiamo leptina e insulina. Questi 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, e in seguito a segnali di sazietà inibiscono l'assunzione di cibo. Sono rappresentati da CART (cocaine amphetamine regulated transcript), così chiamato perché i suoi livelli aumentano in seguito ad assunzione di cocaina e amfetamine, e da α -MSH (melanocyte stimulating hormone), che deriva dal precursore POMC in seguito al suo clivaggio post-traduzionale. I neuropeptidi oressigenici sono invece prodotti dai neuroni AgRP/NPY in seguito a segnali di fame, stimolano l'assunzione di cibo e sono rappresentati da AgRP (agouti related protein), antagonista di α -MSH, e da 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 α -MSH con funzione inibitoria e il neuropeptide AgRP, antagonista che si lega al recettore occupando il sito di legame per α -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.

Per quanto riguarda invece il centro che controlla l'appetito, nell'ipotalamo laterale, è costituito da due gruppi di neuroni: quelli produttori orexina e quelli produttori MCH (melanin concentrating hormone), ormoni ad azione oressigenica. Entrambi i neuroni sono espressi in modo uniforme all'interno di LHA e fanno sinapsi con 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. 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, attraverso meccanismi diretti e indiretti, l'espressione di MCH.

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 anti-aterogena ed anti-infiammatoria, e il suo livello è inversamente correlato all'obesità e all'insulino-resistenza. 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 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.

Infine vi sono altri due ormoni: colicistochenina (CCK) e glucagone 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.

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.

1.3 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 conducono 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'abenula, 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 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 glutamatergico, 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 oppiodi, le endorfine, le enkefaline e le 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 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 nell'ippocampo del ricordo. 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 mesolimbica dopaminergica, 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 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 della depressione, il 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) hanno documentato 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 ad 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'aumentato desiderio verso il cibo gustoso.

1.4 Cannabinoidi e obesità

Tra i regolatori centrali dell'assunzione di cibo è ampiamente implicato il sistema endocannabinoide. Gli endocannabinoidi sono neurotrasmettitori endogeni che si legano ai loro recettori per modulare diversi sistemi fisiologici influenzando le funzioni endocrine, metaboliche, immunitarie, cardiovascolari, neuronali, etc. I recettori per i cannabinoidi, denominati CB1 e CB2, appartengono alla classe di recettori accoppiati alle proteine G. I recettori CB2 si riscontrano prevalentemente a livello periferico mentre i CB1 sono distribuiti soprattutto a livello del sistema nervoso centrale. Diversi studi preclinici e clinici hanno dimostrato che sia i cannabinoidi endogeni come l'anandamide che quelli esogeni, agiscono sui recettori CB1 ipotalamici stimolando l'appetito e la preferenza di cibi ricchi di grassi e carboidrati. Questa proprietà è sfruttata per combattere l'anoressia e la cachessia riscontrabili nei pazienti affetti da tumore in fase terminale o dall'AIDS (Matias et al., 2007; Cota et al., 2003; Devane et al., 1992). Nell'ambito del controllo alimentare, è noto che a livello postsinaptico il GABA agisce al fine di stimolare la sazietà. L'attivazione endocannabinoide a livello del neurone postsinaptico, che può essere indotta dalla sensazione di piacere provocata dalla visione o dal breve assaggio di un gustoso dolce, attenua la sensazione di sazietà provocata dal GABA e stimola di conseguenza la tendenza alla ripresa dell'alimentazione. Questo spiega in termini fisiologici le ben note azioni oressizzanti attribuite ai cannabinoidi di origine vegetale (Pagotto et al., 2008). Oltre a influenzare i comportamenti legati alla gratificazione, nella pulsione verso l'apporto nutrizionale il sistema endocannabinoide è in relazione con il sistema oppioide e con il sistema serotonergico, visto il coinvolgimento della serotonina nel controllo del comportamento alimentare (Pagotto et al., 2006).

Alla luce di queste osservazioni, la ricerca si è indirizzata allo sviluppo di specifici composti in grado di antagonizzare gli effetti mediati dal recettore CB1 per la regolazione del comportamento alimentare dipendente dai cannabinoidi. L'antagonista CB1 SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994), somministrato cronicamente, è stato largamente utilizzato come farmaco anti-obesità in quanto in grado di ridurre l'assunzione di cibo e il peso corporeo in maniera dose dipendente (Padwal and Majumdar, 2007; Di Marzo et al., 2001; Colombo et al., 1998). Il composto, che ha subito uno sviluppo preclinico e clinico, è stato disponibile sul mercato sotto il nome di Rimonabant. Commercializzato nel 2006 e bandito nel 2008, il

Rimonabant ha mostrato gravi effetti collaterali quali ansia, depressione e disturbi neurologici (Beyer et al., 2010; Christensen et al., 2007; Mitchell and Morris, 2007; Steinberg et al., 2007).

Vista l'attuale assenza sul mercato di farmaci anti-obesità con reali effetti benefici, visto l'impatto che l'obesità ha sulla salute e sull'economia pubblica, e considerato il coinvolgimento che il sistema endocannabinoide ha nell'assunzione e nel controllo alimentare, si rende necessario lo sviluppo di nuovi composti con un profilo farmacologico simile al Rimonabant ma con una minore insorgenza di effetti collaterali e un miglioramento dell'efficacia. In questo ambito la ricerca preclinica è volta allo studio dei farmaci su modelli animali il più possibile predittivi delle alterazioni fisiologiche e patologiche nell'uomo. Molti dei modelli di obesità finora utilizzati si basano su mutazioni a carico di geni che controllano il bilancio energetico. In particolare, i ratti Zucker (*fa/fa*) e i topi *db/db*, che presentano una mutazione nel gene codificante per il recettore per la leptina, non sono in grado di riceverne il segnale per un difetto a livello del recettore cellulare di superficie specifico per la leptina, pur producendo una quantità di segnale proporzionale alla loro massa adiposa; i topi (*ob/ob*) sono knock out per la leptina stessa. Dal punto di vista fenotipico questi animali sono obesi, iperfagici e iperinsulinemici e hanno quindi rappresentato sinora un modello adeguato per lo studio delle alterazioni metaboliche associate all'obesità. Numerosi studi, mediante l'utilizzo di diversi paradigmi sperimentali, hanno dimostrato che in questi animali la somministrazione acuta di Rimonabant riduce il consumo di cibo, e un trattamento cronico con il composto è in grado di ridurre il peso corporeo (Liu et al., 2005; Di Marzo et al., 2001; Bensaid et al., 2003; Vickers et al., 2003). Questi modelli animali hanno permesso di chiarire in parte il meccanismo d'azione del Rimonabant che riguarda i sistemi effettori sia centrali che periferici. I principali meccanismi centrali sui quali il Rimonabant esplica la sua efficacia sono l'inibizione della trasmissione mediata dai recettori CB1 nel sistema mesolimbico e della melanocortina, il potenziamento della colecistochinina (CCK) e dei segnali vagali di sazietà nel tronco encefalico. Invece tra i meccanismi periferici si ha l'inibizione della lipogenesi nel tessuto adiposo e in quello epatico, un miglioramento nell'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico e un aumento dell'adiponectina che modula la formazione degli adipociti con effetti pleiotropici sull'infiammazione e sulla protezione da aterosclerosi che invece si hanno nell'obesità (Vemuri et al., 2008; Matias et al., 2007; Di Marzo et al., 2001). Una limitazione all'impiego dei modelli descritti è che sono poco rappresentativi della condizione clinica. Infatti, l'obesità nell'uomo non è dovuta a mutazioni monogeniche ma è il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali tra i quali l'alimentazione gioca un ruolo preponderante. Secondo questa ottica, negli ultimi anni sono stati sviluppati i modelli di topi e ratti DIO (diet induced obesity). Gli animali non possiedono nessuna mutazione, ma sono esposti ad una dieta ad alto tenore di

grassi che determina lo sviluppo dell'obesità, rappresentando quindi un modello altamente predittivo delle alterazioni metaboliche riscontrabili nell'uomo. Questi modelli sono stati utilizzati con successo per lo studio degli effetti metabolici degli antagonisti del recettore CB1 (Lazzari et al., 2010; Thornton-Jones et al., 2006; Poirier et al., 2005).

2. Obiettivi

Allo scopo di limitare e contrastare il problema dell'obesità, minaccia per la salute pubblica e lo sviluppo economico globale, è di primaria importanza la ricerca e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche da attuare in pazienti presentanti tale condizione clinica.

Considerata l'assenza sul mercato di valide terapie dimagranti, e visto il coinvolgimento del sistema endocannabinoide sulla modulazione dei circuiti del piacere e sull'assunzione del cibo, con il presente studio ho proposto la caratterizzazione delle proprietà anti-obesità di un nuovo composto di sintesi antagonista del recettore CB1. Sulla base delle osservazioni cliniche e precliniche sul composto SR141716A, ho individuato un modello sperimentale in grado di rispecchiare il più possibile le modificazioni metaboliche e comportamentali riscontrate nell'uomo.

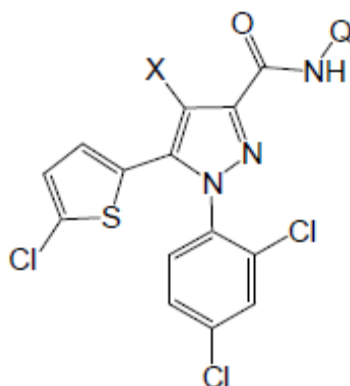
Poiché i meccanismi alla base degli effetti dei ligandi cannabinoidegici sul bilancio energetico non sono ancora stati del tutto chiariti, ho proposto un'analisi delle possibili alterazioni molecolari indotte da un trattamento cronico con il nuovo ligando cannabinoidegico, in paragone sia al composto di riferimento SR141716A che all'esposizione ad una dieta normocalorica.

Ho indirizzato lo studio dei meccanismi d'azione all'individuazione di alterazioni dell'espressione di geni coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico e del comportamento alimentare in tessuti centrali e periferici.

Inoltre, poiché il Rimonabant è stato ritirato dal commercio a causa della depressione e dei casi di suicidio che dal suo uso cronico sono derivati, ho ritenuto necessario studiare l'azione del composto di nuova sintesi a livello del sistema mesolimbico, responsabile dei meccanismi del piacere e della gratificazione.

3. Sintesi

Il composto NESS038C6, 7-bromo-1-(2,4-dichlorophenyl)-N-(piperidin-1-yl)4,5-dihydro-1H-thieno[2,3-g]indazole-3-carboxamide, è stato sintetizzato presso i laboratori di PharmaNess allo scopo di verificare le potenzialità di composti con struttura differente da quella del composto di riferimento Rimonabant e degli analoghi tiofenici aventi struttura:

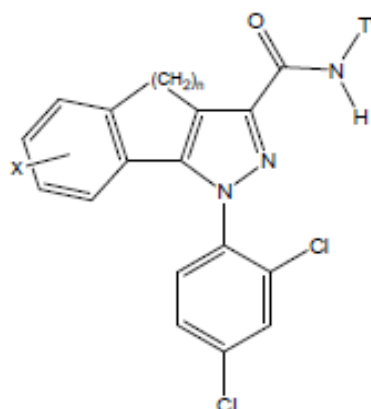


in cui:

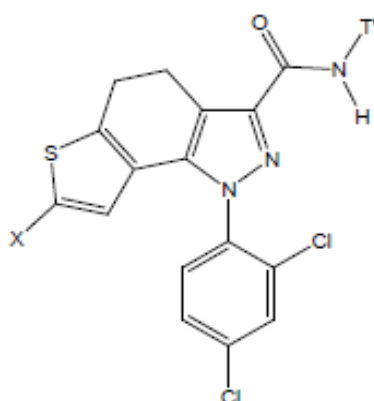
X= metile, etile o propile;

Q= ciclo alchile, eterocicloalchile, arile

In funzione dei promettenti risultati ottenuti in precedenza presso i laboratori di PharmaNess con derivati pirazolici triciclici condensati a struttura base:

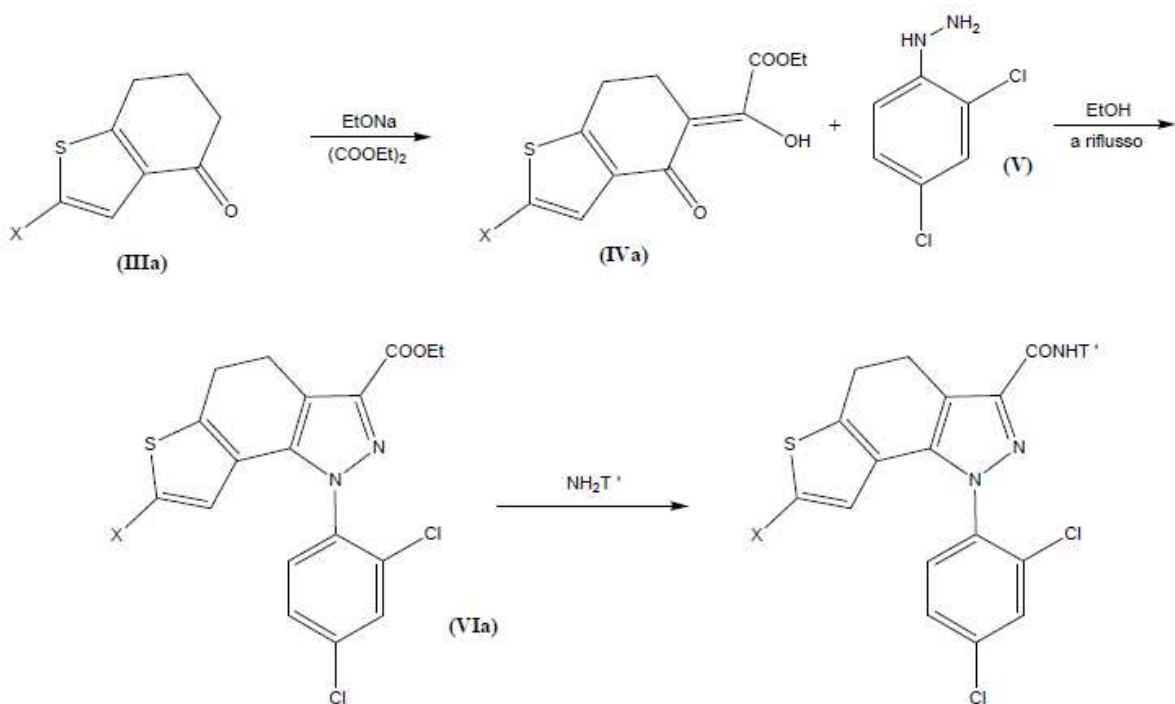


caratterizzati da elevata affinità e selettività verso i recettori dei cannabinoidi, sono state sviluppate nuove vie di sintesi per l'ottenimento di derivati omologhi, ad anello centrale a sei atomi di carbonio, contenenti un anello tiofenico al posto del benzene:

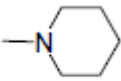


La sintesi del composto NESS038C6 è stata effettuata secondo quanto indicato nello schema di seguito riportato.

Gli α -idrossi- γ -chetoesteri di formula (IVa), sono stati sintetizzati a partire da un composto di formula (IIIa) con etossido di sodio e dietilossalato (condensazione di Claisen) in etanolo a refluxo. I composti (IVa) sono stati condensati con una diclorofenilidrazina cloridrato di formula (V), per ottenere l'estere etilico del composto tricyclico condensato (VIa). La reazione di quest'ultimo con l'appropriata ammina ha consentito l'ottenimento del derivato carbossiamidico di interesse.



Sono di seguito riportati per il NESS038C6: la resa complessiva del processo di sintesi; il punto di fusione (p.f.); le bande IR significative; il profilo dello spettro ¹H-NMR.

Composto	T'	X	Resa (%)	p.f. (°C)	IR (λ = cm ⁻¹)	¹ H-NMR (δ ppm)
NESS038C6		Br	55	145	3202 (NH), 1650 (C=O)	1.42-1.43 (m, 2H); 1.72-1.74 (m, 4H); 2.82-2.87 (m, 4H); 2.99 (t, 2H, J = 8.2 Hz); 3.29 (dt, 2H, J = 8.2 Hz); 6.11 (s, 1H); 7.45 (s, 2H); 7.60 (br s, 1H, NH scambia con D ₂ O); 7.63 (s, 1H)

4. Caratterizzazione *ex vivo* ed *in vitro* di un nuovo composto di sintesi CB1 antagonista: NESS038C6

4.1 Binding recettoriale

Allo scopo di valutare l'affinità e la selettività del NESS038C6 verso i recettori cannabinoidergici CB1 e CB2 sono stati effettuati studi di binding recettoriale (*radioreceptor binding assay*). La sperimentazione è stata condotta secondo le linee guida della Comunità Europea per la sperimentazione animale (EEC n.86/609). Sono stati impiegati topi maschi CD1 (Charles River, Italia), alloggiati 20 per gabbia in condizioni di stabulazione standard (temperatura $22\pm 2^\circ\text{C}$, umidità relativa 60%, illuminazione artificiale con ciclo luce buio di 12 ore). Cibo e acqua sono stati disponibili ad libitum.

Per il binding per i recettori cannabinoidergici CB1 è stato impiegato il cervello in toto (escluso il cervelletto), mentre per il binding per i recettori cannabinoidergici CB2 è stata utilizzata la milza.

Il tessuto (cervello o milza) è stato rapidamente dissezionato e mantenuto in ghiaccio, quindi omogeneizzato in 15 volumi (p/v) di tampone TME (50 mM Tris, 1 mM EDTA e 3 mM MgCl_2 , pH 7,4) mediante un Ultra-Turrax e centrifugato per 10 min a $1086 \times g$ in una centrifuga refrigerata a 4°C . Il risultante sovranatante è stato centrifugato a $45000 \times g$ per 30 min a 4°C mediante l'utilizzo di un rotore Beckman SW41, ed il pellet finale è stato risospeso in 50 volumi di TME. Le membrane ottenute (50-80 μg di proteine) sono state incubate in presenza di 1 nM di [^3H]-CP55,940 per 1 h a 30°C in un volume finale di 0,5 ml di tampone TME contenente 5 mg/ml di albumina di siero bovino (BSA). Il binding non specifico è stato misurato in presenza di 1 μM di CP55,940. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in provette di polipropilene pretrattate con Sigma-Cote (Sigma Chemical Co. Ltd., Poole, UK) per ridurre il binding non specifico. Per la costruzione delle curve di competizione sono state usate otto differenti concentrazioni di ciascun composto. Come composti di riferimento sono stati utilizzati: SR141716A per i recettori CB1 e SR144528 per i recettori CB2, sintetizzati presso i laboratori di PharmaNess.

L'incubazione è stata interrotta mediante l'aggiunta di tampone TME (a 4°C) contenente 5 mg/ml di BSA e filtrazione sotto vuoto attraverso filtri Whatman GFC pretrattati con 0,5% di polietilamina (PEI), utilizzando un apparecchio filtrante (Brandell, Gaithersburg, MD, USA). I filtri sono stati lavati 3 volte con 5 ml di tampone Tris HCl (pH 7,4, 4°C) contenente 1 mg/ml di BSA e posti singolarmente in vials di plastica contenenti 4 ml di liquido scintillante (Ultima Gold MV, Packard). La radioattività presente nei filtri è stata misurata da uno spettrofotometro

scintillatore (Tricarb 2100, Packard, Meridien, USA). La determinazione delle proteine è stata eseguita con il metodo di Bradford (1976) utilizzando il protocollo e i reagenti forniti dalla Bio-Rad (Milano, Italia).

Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i risultati confermati in cinque esperimenti indipendenti. L'elaborazione dei risultati e l'estrapolazione dei valori delle IC_{50} (concentrazione che inibisce il 50% del binding specifico) è stata effettuata con l'ausilio del programma GraphPad Prism (San Diego CA). I valori di IC_{50} dei composti testati sono stati trasformati in costante di inibizione (K_i) tramite l'equazione di Cheng-Prusoff ($K_i = IC_{50}/1+[S]/K_m$) (Chang e Prusoff, 1973).

La seguente tabella mostra le affinità sui recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2 del nuovo composto di sintesi NESS038C6 espresse come valore assoluto (K_i). Sono inoltre riportati i valori di K_i ottenuti con i composti di riferimento SR144528, CP55,940 e SR141716A.

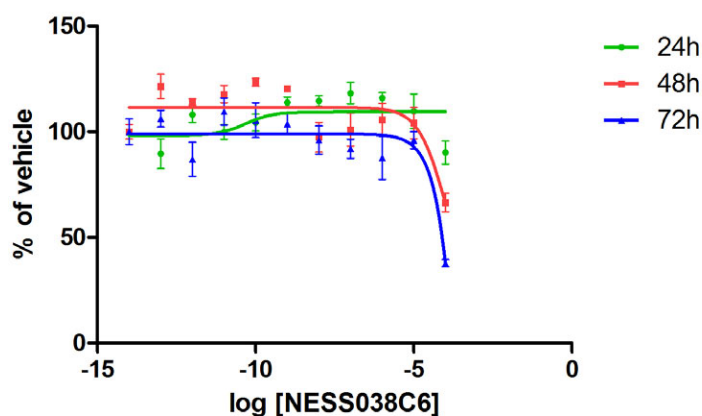
Affinità recettoriale			
Composto	K_i CB ₁ (nM)	K_i CB ₂ (nM)	CB ₁ /CB ₂
NESS038C6	4,47 ± 0,14	36,75 ± 5	0,121
SR144528	70 ± 10	0,28 ± 0,04	250
CP55,940	1,5 ± 0,12	1,11 ± 0,09	1,35
SR141716A	1,8 ± 0,075	514 ± 5	0,003

Il NESS038C6 presenta un'alta affinità nei confronti del recettore CB1 ($K_i = 4,47 \pm 0,14$), ma non nei confronti del recettore CB2 ($K_i = 36,75 \pm 5$).

4.2 Studi di tossicità *in vitro*

Per la valutazione dell'eventuale tossicità del composto di nuova sintesi NESS038C6, cellule di neuroblastoma umano N1E-115 (ECACC European Collection of Cell Culture), esprimenti selettivamente i recettori cannabinoidergici di tipo CB1, sono state esposte a diverse concentrazioni (10^{-4}M ÷ 10^{-14}M) del composto in esame. A tal fine, le cellule sono state propagate in fiasche per colture cellulari da 75 cm² (37°C, 5% CO₂) in appropriato terreno di coltura e additivi (RPMI, 10% Siero Fetale Bovino, 2mM L-Glutamina, Penicillina/Streptomina, Fungizone, Gentamicina A, Sigma-Aldrich). Raggiunta la confluenza, le cellule sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti per l'esecuzione dei trattamenti farmacologici. Dopo 24, 48 e 72 ore è stata valutata la vitalità cellulare con il test ATP-lite (Perkin Elmer, Italia). Il test utilizzato si basa sulla produzione di luce causata dalla reazione tra l'ATP con il sistema luciferina/luciferasi. La luce emessa è proporzionale alla concentrazione di ATP, marker di vitalità cellulare in quanto presente in tutte le cellule metabolicamente attive. La chemiluminescenza è stata misurata mediante lo spettrofotometro Victor III (Perkin Elmer, Italia).

Dal grafico di seguito riportato (Graph Pad Prism, San Diego CA) si evince, per ogni intervallo di tempo, la scarsa tossicità della molecola in esame.



4.3 Misurazione della temperatura corporea

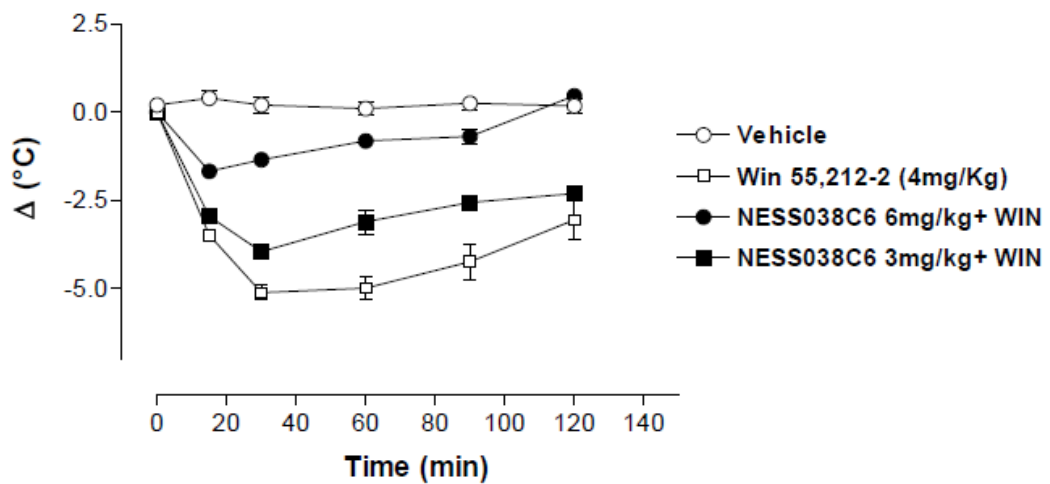
Come è noto, i composti ad attività cannabimimetica mostrano in vivo ipotermia (Smith et al., 1994; Martin et al., 1991). Essendo il sito centrale di tali recettori che regolano la temperatura posizionato nel nucleo anteriore preottico dell'ipotalamo (Rawls et al., 2002), per poter spiegare la funzione di termoregolazione i composti con attività verso i recettori cannabinoidergici devono essere in grado di passare la barriera emato-encefalica. Nel caso di composti CB1 antagonisti in grado di passare la barriera emato-encefalica, il trattamento non comporta alcuna variazione della temperatura corporea, tuttavia può implicare un'attività antagonista nei confronti di agonisti CB1 di riferimento come WIN 55,212-2, contrastando quindi l'ipotermia indotta da questi ultimi.

Allo scopo di avere un'indicazione sulla capacità della molecola di nuova sintesi NESS038C6 di passare la barriera ematoencefalica, sulle basi della metodica indicata da M.Rinaldi-Carmona et al. in *FEBS Letters*; 1994, è stata effettuata la valutazione delle proprietà termoregolatrici. In particolare, la procedura è stata implementata utilizzando il composto SR141716A quale antagonista CB1 di riferimento in grado di passare la barriera emato-encefalica. La temperatura rettale nel topo è stata determinata attraverso un termometro elettronico inserito ad una profondità di 2 mm. Le misure sono state effettuate su topi acclimatati per un'ora. La temperatura rettale è stata determinata prima e dopo (da 30 a 120 minuti) la somministrazione i.p. di SR141716A. Successivamente è stato valutato l'effetto centrale del composto di riferimento nell'antagonizzare l'azione dell'agonista CB1 di riferimento WIN 55,212-2 (Tocris Bioscience, UK). A tal fine le misure della temperatura rettale sono state effettuate previa somministrazione i.p. di SR141716A 30 minuti prima della somministrazione di WIN 55,212-2. In seguito alla determinazione della temperatura corporea previa somministrazione con il farmaco di riferimento SR141716A, analoghe misurazioni sono state effettuate con il composto in esame NESS038C6.

I risultati ottenuti attraverso l'impiego di Rimonabant riproducono i dati di letteratura relativi al composto di riferimento: come indicato nella tabella di seguito riportata, tale derivato non ha infatti mostrato alcun effetto sulla temperatura corporea quando somministrato da solo. Il Rimonabant è stato invece in grado di agire a livello centrale contrastando la riduzione della temperatura corporea indotta da WIN 55,212-2.

Tempo dal trattamento (minuti)	Temperatura corporea (°C)		
	WIN 55,212-2 (3mg/kg)	WIN 55,212-2 (3mg/kg) e SR141716A 0,1mg/kg	WIN 55,212-2 (3mg/kg) e SR141716A 0,5mg/kg
0	38,0	----	----
15	36,0	----	----
30	34,0	35,3	37,0
60	34,5	36,9	37,8
90	35,8	37,5	37,9
120	36,8	----	----

Il grafico seguente mostra come anche il NESS038C6 sia stato in grado di antagonizzare l'ipotermia indotta dalla somministrazione nel topo dello stesso cannabinoide agonista di riferimento WIN 55,212-2, mostrando caratteristiche proprie di un antagonista CB1 in grado di passare la barriera ematoencefalica.



4.4 Analisi Western Blotting

Il recettore CB1, così come il recettore CB2, appartiene all'ampia famiglia di recettori di membrana accoppiati alle proteine G (GPCRs) (Munro S et al, 1993), i quali controllano la trasduzione di numerosi segnali intracellulari. Tra i processi intracellulari avviati dalla stimolazione delle proteine G si ha l'attivazione della via delle protein-chinasi tramite fattori mitogeni (Mitogen-activated protein kinase – MAPK) (Coonse KG et al, 2007). Le MAPK attivate fosforilano i loro specifici substrati sui residui serinici o treoninici portando all'attivazione di diversi fattori di trascrizione. La loro attivazione è più frequentemente associata all'induzione dell'apoptosi (Martindale JI e Holbrook NJ, 2002). Fra le MAPK le Erk (Extracellular signal-regulated kinase), che si distinguono in p44 e p42 MAPK (rispettivamente Erk1 e Erk2), agiscono in una cascata di fosforilazione proteica coinvolta nella regolazione di differenziazione e crescita cellulare (Marshall, CJ, 1995). Le MAPK sono attivate da un'ampia varietà di segnali extra cellulari. E' stato dimostrato che anche l'attivazione dei recettori cannabinoidergici determina una rapida fosforilazione ed una attivazione del segnale extracellulare connesso alle chinasi (ERK1 / 2 o p44/p42-MAPK) (Murineddu G., 2006).

La capacità del composto NESS038C6 di modulare i recettori CB1 è stata valutata attraverso un modello in vitro basato sull'impiego della linea cellulare di neuroblastoma di topo N1E-115, che esprime selettivamente i recettori cannabinoidergici di tipo CB1.

La linea cellule N1E-115 (European Collection of Cell Cultures) è stata propagata sino al raggiungimento della confluenza a 37°C, 5% CO₂, in RPMI-1640 Medium integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS), Penicillin-Streptomycin 1X, L-Glutamine 2 mM, Amphotericin B 2.5 µg/ml e Gentamicin 50 µg/ml (Sigma-Aldrich). Arrivate a confluenza, le cellule sono state trasferite in piastre per colture cellulari (100 x 20 mm, 55cm², volume finale 10 ml) per il trattamento farmacologico. I composti di riferimento ACEA (agonista selettivo CB1, Tocris Bioscience UK) e SR141716A (antagonista selettivo CB1) ed il composto in esame NESS038C6, precedentemente preparati in DMSO, sono stati diluiti alla concentrazione finale in buffer isotonic Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X.

Raggiunta la confluenza, le cellule sono state suddivise in gruppi sperimentali ed esposte per 10 minuti all'azione del composto agonista selettivo CB1 ACEA (20 nM) e a differenti concentrazioni di NESS038C6 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 75 nM e 125 nM).

Del composto di nuova sintesi NESS038C6 è stata inoltre valutata l'attività antagonista sul recettore CB1. A tal fine, in una ulteriore seduta sperimentale, le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni (5 nM, 10 nM e 75 nM) dell'antagonista di riferimento SR141716A (1

uM) e della molecola in fase di studio NESS038C6 prima di essere trattate con l'agonista ACEA.

In seguito al trattamento farmacologico l'azione delle molecole è stata interrotta lisando le cellule e procedendo all'estrazione proteica. La sospensione cellulare è stata trasferita in tubi Falcon e messa a centrifugare per 10 minuti (1000 rcf, 4°C). Il pellet è stato risospeso in un Lysis Buffer costituito da: HEPES 20 mM, EDTA 0.2 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 5 mM, Glycerol al 12%, NP40 allo 0.1%. Al Lysis Buffer sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi Aprotinin 1ug/ml, Pepstatin 0.7 ug/ml, Leupeptin 0.5 ug/ml, Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 0.5 mM. Il lisato è stato trasferito in tubi Eppendorf da 1.5 ml e messo a centrifugare per 10 min (10000 rcf, 4°C). Il surnatante contenente l'estratto proteico è stato trasferito in tubi Eppendorf da 1.5 ml.

La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata usando il Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen™) ed il sistema Qubit® Quantitation Platform (Invitrogen™). 40 µg di proteine per pozzetto sono state separate su Bis-Tris Gel (NuPAGE® Novex® Invitrogen™) al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad).

La membrana è stata incubata over night con l'anticorpo primario Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (diluizione 1:1000) (Millipore, Italia) e successivamente per due ore con l'anticorpo secondario Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (diluizione 1:2000) (Invitrogen, Italia).

Il segnale di chemiluminescenza è stato visualizzato mediante l'utilizzo di Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

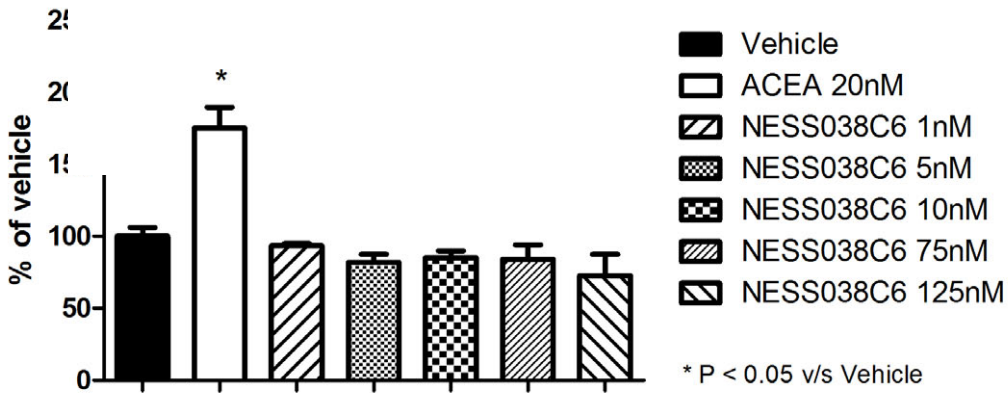
Le bande immunoreattive sono state visualizzate tramite il Fujifilm Las-1000 Analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte) e la densità ottica è stata misurata usando il software AIDA 2.11 (Raytest Isotopenmessgeräte).

I differenti livelli di P-ERK sono stati espressi come percentuale di incremento rispetto al controllo \pm SEM. L'analisi statistica è stata effettuata tramite il post test one-way Anova seguito dal Dunnet's multiple comparison utilizzando il programma GraphPad Prism (San Diego, CA).

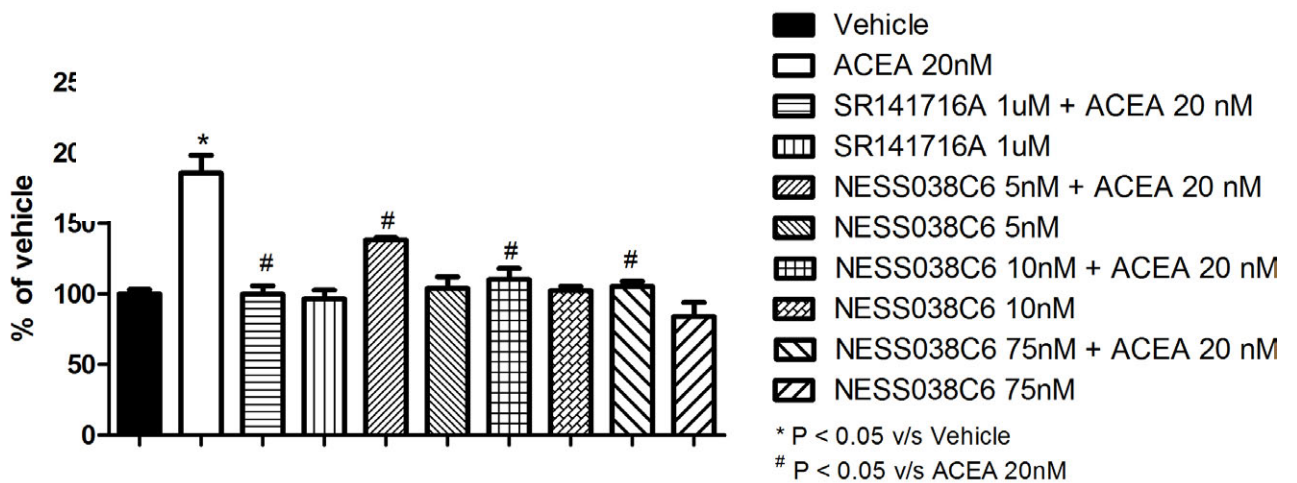
Il trattamento con il NESS038C6 non ha determinato alcuna attivazione recettoriale (panel A), mentre un pretrattamento con il composto in esame, seguito da un trattamento con l'agonista CB1 di riferimento ACEA, ha determinato il blocco del recettore (panel B).

I risultati ottenuti mostrano quindi un'attività antagonista sul recettore CB1 da parte del composto in esame.

A



B



5. Valutazione *in vivo* dell'effetto anoressizzante del composto di nuova sintesi NESS038C6

L'attività sperimentale è stata indirizzata all'individuazione di un modello sperimentale in grado di delineare in misura ottimale l'attività farmacologica del composto in esame e rispecchiare il più possibile le modificazioni metaboliche e comportamentali riscontrate nell'uomo.

Il modello di obesità selezionato prevede l'utilizzo di topi DIO (diet induced obesity) e rappresenta un'evoluzione rispetto ai modelli genetici riportati in letteratura, poco rappresentativi della situazione clinica in quanto basati su mutazioni monogeniche. Si basa sull'induzione dell'obesità in topi C57BL/6J tramite l'esposizione per 4 settimane ad una dieta iperlipidica, che determina negli animali uno sviluppo dell'obesità simile a quello dell'uomo.

Topi DIO maschi C57BL/6J di 30-35 g (Charles River Italia, Calco, Italia) sono stati stabulati a partire dalla 6^a settimana di vita con una dieta ad elevato tenore di grassi (SSNIFF, Germania) tale da indurre un notevole aumento di peso. Cibo e acqua sono stati disponibili *ad libitum*.

Gli ambienti di stabulazione sono stati mantenuti ad una temperatura di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una umidità del $55\pm 5\%$ e con un ciclo giorno/notte di 12 ore invertito (buio dalle 07:00 alle 19:00). Durante la fase di buio, una luce rossa era la sola risorsa di luce.

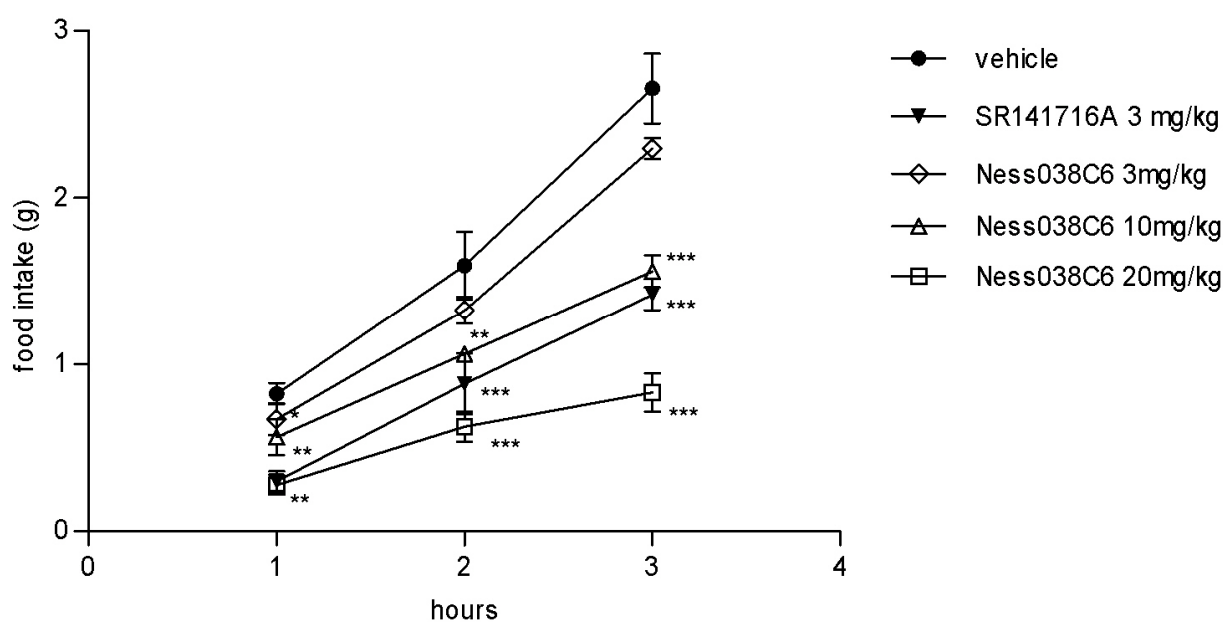
Tutte le procedure sperimentali sono state condotte in accordo con le norme per il controllo del benessere degli animali da laboratorio (D.lvo 116/91).

5.1 Trattamento acuto

L'effetto del composto di nuova sintesi NESS038C6 è stato comparato con quello del composto di riferimento SR141716A. Il protocollo utilizzato è ampiamente validato dalla letteratura. Dopo 4 settimane di dieta iperlipidica i topi DIO (7 per gruppo sperimentale), stabulati come sopra descritto, prima dell'esperimento 18 ore sono stati privati del cibo (Di Marzo et al., 2001) e divisi in 5 gruppi sperimentali: veicolo (soluzione fisiologica + tween 80 0.1%), SR141716A (3mg/kg) e NESS038C6 (3, 10 e 20 mg/kg). Il giorno dell'esperimento gli animali sono stati trattati per via intraperitoneale con i composti oggetto di studio. Quindici minuti dopo il trattamento, agli animali è stata presentata una quantità nota di cibo. Il consumo di cibo è stato valutato ogni ora per 3 ore tramite pesata del cibo residuo.

In figura si nota come, alla dose 3 mg/kg, l'SR141716A induca una diminuzione significativa rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.01$ alla 1^a ora, $P < 0.001$ alla 2^a e alla 3^a ora), confermando quanto riportato in letteratura in diversi modelli murini (Di Marzo et al., 2001).

Alla stessa dose il NESS0038C6 non è in grado di inibire il consumo di cibo rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.05$ alla 1^a ora). Il composto mostra invece un effetto significativo alla dose di 10 mg/kg ($P < 0.01$ alla 1^a e alla 2^a ora, $P < 0.001$ alla 3^a ora). Alla dose 20 mg/kg il NESS0038C6 determina una significativa diminuzione del food intake in tutti e tre gli intervalli di tempo rispetto al veicolo ($P < 0.01$ alla 1^a ora, $P < 0.001$ alla 2^a e alla 3^a ora).



Effetto della somministrazione acuta di SR141716A (3 mg/Kg i.p.) e NESS038C6 (3, 10 e 20 mg/kg i.p.) sul food intake in modelli animali DIO. I risultati sono espressi come media \pm SEM e sono stati raccolti ogni ora per tre ore (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. i veicoli VHFD).

5.2 Trattamento cronico

Dopo 4 settimane di esposizione alla dieta iperlipidica i topi DIO, alloggiati in gabbie singole, sono stati selezionati in modo che i diversi gruppi sperimentali presentassero lo stesso peso medio all'inizio del trattamento. Per il trattamento cronico sono stati utilizzati 6 gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno ($n=7$): veicolo dieta iperlipidica, veicolo dieta standard, SR141716A 10 mg/kg dieta iperlipidica, SR141716A 10 mg/kg dieta standard, NESS038C6 30 mg/kg dieta iperlipidica e NESS038C6 30 mg/kg dieta standard. Gli animali sono stati trattati quotidianamente, per 30 giorni, per via intragastrica mediante un'apposita cannula, e ogni

giorno sono stati misurati il peso dell'animale (g), il peso dell'acqua (g) e il cibo consumato (g). La dose di SR141716A è stata scelta sulla base di precedenti studi (Thornton-Jones et al., 2006) ed è di circa tre volte più alta rispetto alla dose usata per gli studi acuti perchè la somministrazione intragastrica comporta un effetto di primo passaggio attraverso il fegato. Allo stesso modo la dose del NESS038C6 è stata triplicata rispetto alla dose ritenuta più efficace dagli studi in acuto.

Alla fine del trattamento cronico sono stati valutati i parametri relativi al comportamento alimentare, consumo di cibo e kJ assunte, consumo d'acqua, variazione del peso corporeo. Per poter valutare più accuratamente l'azione dei composti sul metabolismo animale è stato inoltre analizzato l'energy intake, parametro che relaziona le kJ assunte con l'alimentazione con la variazione di peso nel periodo di trattamento cronico.

Agli animali è stato prelevato il sangue per gli esami emato-chimici, e dopo il sacrificio sono stati isolati alcuni distretti centrali (ipotalamo, ippocampo, corteccia prefrontale, amigdala, nucleus accumbens, striato) e periferici (grasso viscerale) per lo studio dell'espressione genica di diversi marcatori coinvolti nei circuiti fame/sazietà e gratificazione/piacere. A livello dei distretti centrali è stata valutata l'espressione di due neuropeptidi anoressigenici: la Prooppiomelanocortina (POMC) e la Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), e due neuropeptidi oressigenici: il Neuropeptide Y (NPY) e la Agouti related peptide (AgRP). E' stata inoltre valutata, nell'ipotalamo, l'espressione di tre recettori coinvolti nei circuiti centrali della fame/sazietà come il recettore dei cannabinoidi 1 (CB1), il recettore della leptina (LEP-R) e il recettore dell'insulina (INS-R).

A fine trattamento farmacologico è stato isolato anche il grasso viscerale addominale, che è stato opportunamente trattato per l'estrazione dell'RNA e per la valutazione dell'espressione genica della leptina e dell'adiponectina.

E' stata inoltre valutata l'espressione dei modulatori coinvolti nei processi della gratificazione e del piacere, quali il trasportatore della dopamina (DAT), il trasportatore della noradrenalina (NET), il trasportatore della serotonina (SERT), la dopamina β -idrossilasi (DBH), il cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1) e la neurotrofina Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

- *Estrazione dell'RNA*

L'ultimo giorno di trattamento cronico gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale. Diversi tessuti, tra cui ipotalamo e tessuto adiposo viscerale, sono stati dissezionati e conservati a -80° C.

L'RNA totale è stato estratto secondo la metodica di Chomczynsky and Sacchi (1987), mediante l'uso del reagente Trizol (Invitrogen, Italia) contenente una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato. I campioni sono stati omogeneizzati in Trizol (1 ml per 100 mg di tessuto) e, dopo l'aggiunta di cloroformio (0.2 ml per 1 ml di Trizol), centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C. La miscela, dopo centrifugazione, si è separata in 3 fasi: una fase rossa contenente il fenolo e il cloroformio, un'interfase, e una fase acquosa superiore, contenente l'RNA, che è stata prelevata e trasferita in nuovi tubi. La precipitazione dell'RNA è stata effettuata mediante aggiunta di isopropanolo (0.5 ml per 1 ml di Trizol) e centrifugazione per 10 minuti a 12000xg a 4°C. Il pellet di RNA così ottenuto è stato lavato con etanolo al 75% (1 ml per 1 ml di Trizol) e centrifugato a 7500xg per 5 minuti a 4°C. Il pellet di RNA è stato quindi risospeso in acqua RNase free (Invitrogen, Italia) e sottoposto a lettura spettrofotometrica a 260, 280 e 320 nm.

- *RT-PCR*

In seguito a digestione con DNase I, l'RNA (0.5 µg) è stato incubato per 5 minuti a 65°C con 100 ng di random primers e dNTPs 0.5 mM. E' stata quindi aggiunta una miscela contenente l'enzima SUPERScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Italia) in un tampone contenente Tris-HCl (50 mM, pH 8.5), KCl 75 mM, MgCl₂ 3mM, DTT 10 mM, e 20 U di RNase OUT. I campioni sono stati incubati a 25°C per 5 minuti, 50°C per 45 minuti e infine la reazione è stata inattivata mediante riscaldamento a 70°C per 15 minuti.

- *PCR quantitativa*

E' stata valutata l'espressione di diversi geni coinvolti nel metabolismo energetico in aree centrali e periferiche. Sono stati utilizzati sistemi di espressione genica validati TaqMan[®] MGB probe per assicurare la specificità dei geni analizzati specifici per il topo. La beta-actina è stata utilizzata come gene housekeeper per la normalizzazione dei dati. Le reazioni di real time PCR sono state effettuate in duplicato in piastre ottiche da 96 pozzetti mediante il sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection (Applied Biosystems, CA). Le sonde sono state marcate con un marcatore fluorescente all'estremità 5' e un quencher non fluorescente all'estremità 3'. Le condizioni di PCR sono state 95°C per 10 minuti, 50 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

L'analisi statistica dei dati (one-way ANOVA) è stata effettuata tramite il programma GraphPad Prism (San Diego, CA).

- *Parametri ematici*

La regolazione dell'espressione dei modulatori dei pathways molecolari fame-sazietà si completa con i dati emato-chimici ottenuti sugli stessi campioni in cui si è effettuata l'analisi molecolare. A fine trattamento cronico sono stati prelevati da ogni singolo animale C57BL/6J DIO 500/700 ul di sangue, successivamente centrifugati. Il siero ottenuto, circa 200/300 ul, è stato sottoposto all'analisi emato-chimica, effettuata con lo strumento KeyLab (BPC BioSed, Italia), dei parametri glucosio, trigliceridi, colesterolo totale, transaminasi ALT e GPT, fosforo.

L'analisi statistica dei dati (one-way ANOVA) è stata effettuata tramite il programma GraphPad Prism (San Diego, CA).

- *Statistica*

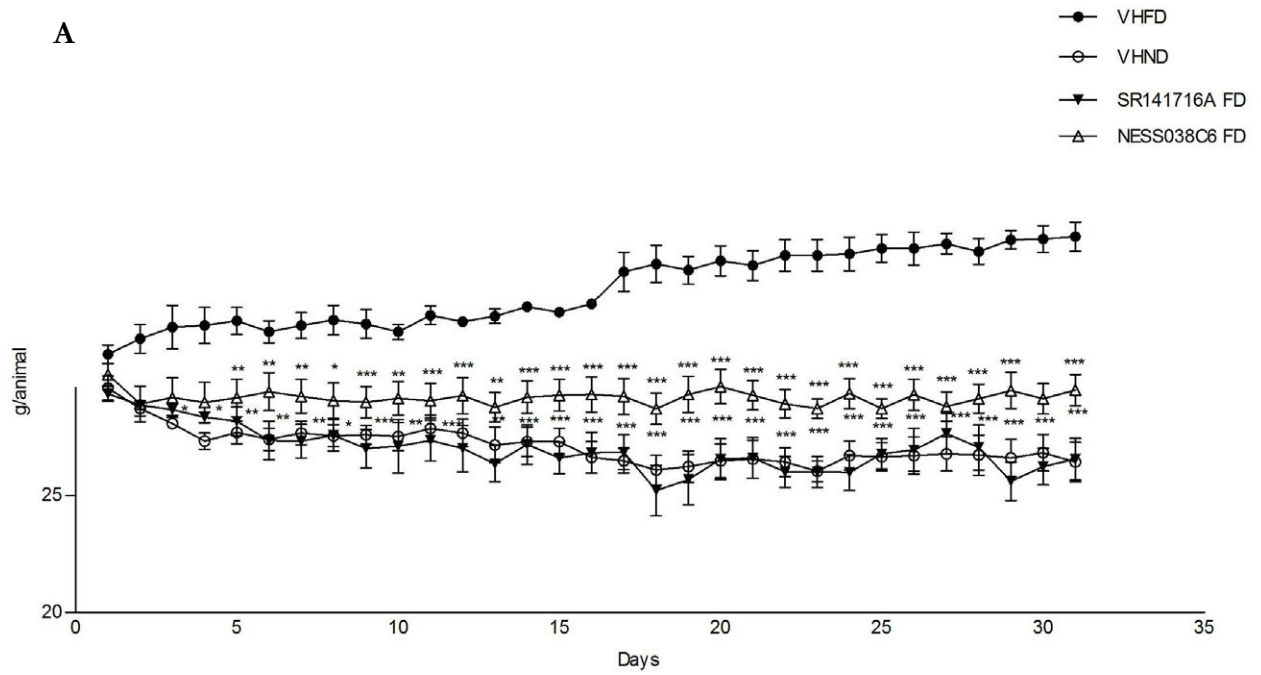
La comparazione statistica dei risultati del comportamento alimentare, delle variazioni di peso e dell'energy intake è stata effettuata utilizzando il test del two-way ANOVA per prove ripetute (limite di significatività $P < 0.05$) seguito dal Bonferroni post hoc test per la comparazione dei gruppi. La comparazione dei dati di espressione genica è stata effettuata con il test del one-way ANOVA (limite di significatività $P < 0.05$) seguito dal Newman-Keuls post hoc test per la comparazione dei gruppi.

L'elaborazione grafica e i test statistici sono stati eseguiti mediante il programma GraphPad Prism (San Diego, CA).

5.2.a Valutazione del comportamento alimentare

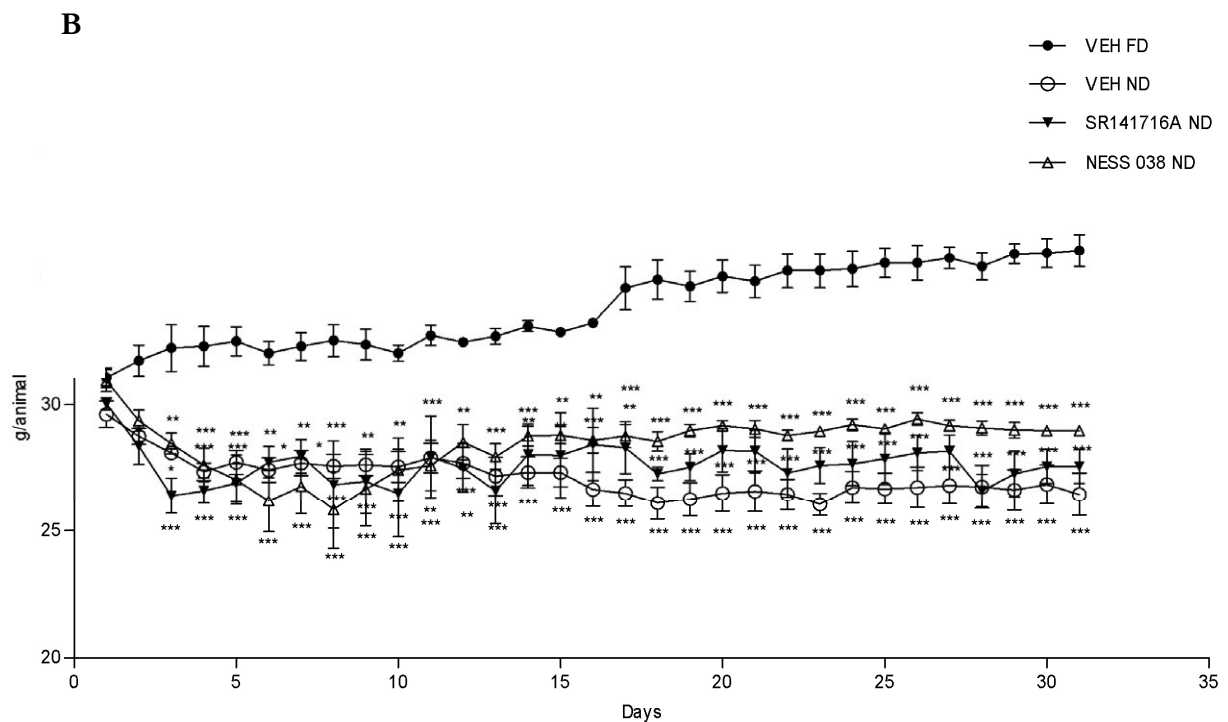
Variazione del peso animale C57BL/6J-DIO dopo trattamento cronico con NESS038C6 e SR141716A

Il panel A mostra la variazione di peso corporeo indotta da un trattamento con NESS038C6 e con SR141716A in animali con una dieta ipercalorica, e la variazione di peso determinata, nel gruppo di controllo, dal passaggio ad una dieta normocalorica. I dati evidenziano un significativo decremento del peso corporeo nel gruppo sperimentale dei veicoli nutriti con una dieta normocalorica. Lo stesso andamento, statisticamente significativo rispetto al veicolo nutrito con una dieta iperlipidica, è riscontrabile negli animali trattati con il composto NESS038C6 e con l'SR141716A.



I valori sono espressi come media \pm SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs VHFD, [$F_{\text{interaction}}(120, 540) = 8.212$ $p < 0.0001$; $F_{\text{treatment}}(4, 540) = 15.66$, $p < 0.0001$; $F_{\text{days}}(5, 540) = 5.408$, $p < 0.0001$]

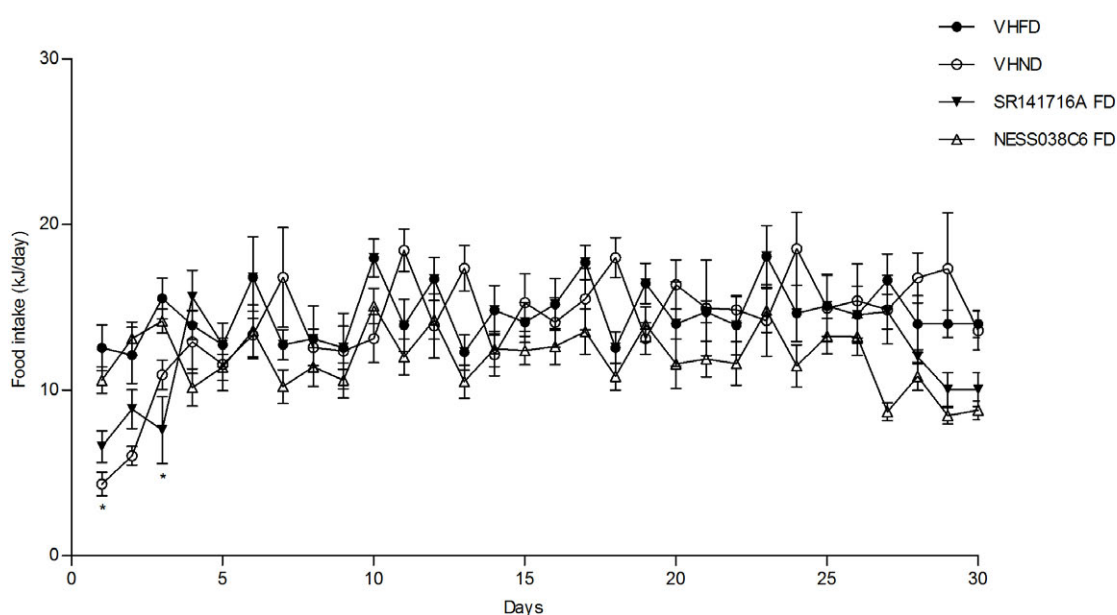
Nel panel B, poichè all'effetto farmacologico si aggiunge l'azione dello "switch" di dieta, il decremento di peso corporeo è più marcato.



I valori sono espressi come media \pm SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs VHFD, [$F_{\text{interaction}}(120, 480) = 3.287$ $p < 0.0001$; $F_{\text{treatment}}(4, 480) = 25.71$, $p < 0.0001$; $F_{\text{days}}(30, 480) = 5.283$, $p < 0.0001$]

Consumo di cibo in animali C57BL/6J-DIO dopo trattamento cronico con NESS038C6 e SR141716A, espresso in kJ/days

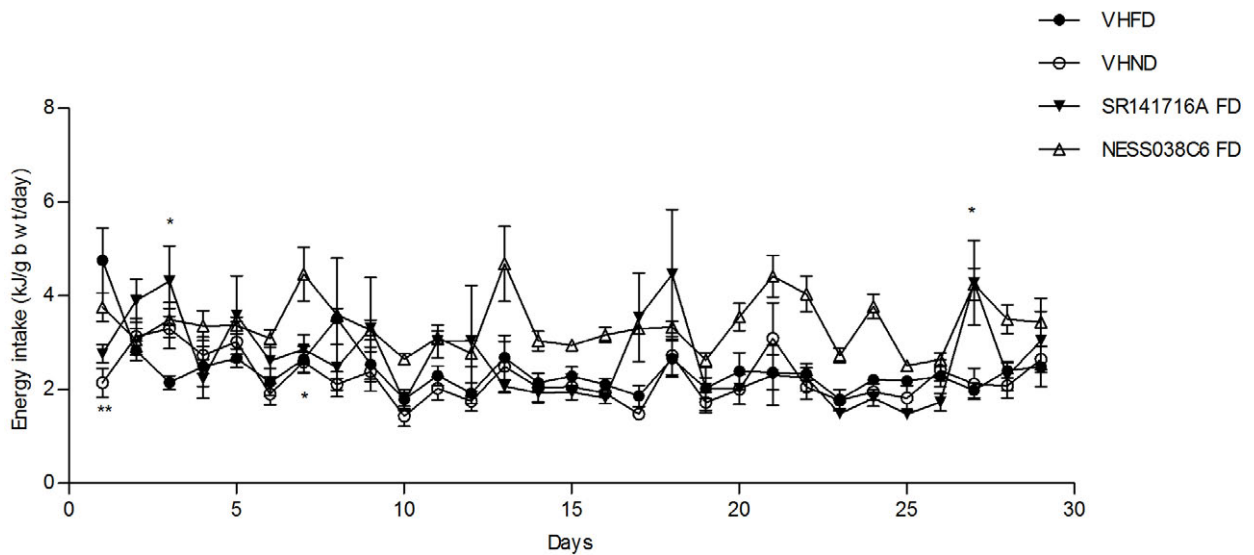
Il grafico di seguito rappresentato mostra il consumo di cibo in animali C57BL/6J-DIO dopo trattamento cronico con NESS038C6 e SR141716A, espresso in kJ/day. Nei primi giorni di trattamento cronico, l'SR141716A e il VHND portano ad un minore consumo di cibo rispetto al VHFD ed al NESS038C6. Questa fase, dovuta rispettivamente all'effetto ipofagico dell'SR141716A e al cambio di dieta, è superata a partire dal quinto giorno.



I valori sono espressi come media \pm SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale. * $p < 0.05$ vs VHFD, [$F_{\text{interaction}}$ (116, 1044) = 2.787 $p < 0.0001$; $F_{\text{treatment}}$ (4, 1044) = 1.836, $p = 0.143$; F_{days} (29, 1044) = 9.028, $p < 0.0001$]

Energy intake in animali C57BL/6J-DIO dopo trattamento cronico con NESS038C6 e SR141716A, espresso in kJ/days

L'energy intake relaziona le kJ assunte con l'alimentazione con la variazione di peso durante il periodo di trattamento cronico, consentendo quindi un'accurata valutazione dell'azione di diversi composti sul metabolismo animale. Dal grafico seguente si evidenzia come, nonostante tutti i gruppi sperimentali seguano lo stesso andamento generale, gli animali trattati con il composto NESS038C6 mostrino un consumo energetico costantemente più marcato rispetto agli altri gruppi sperimentali.



I valori sono espressi come media \pm SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs VHFD, [$F_{\text{interaction}}(112, 692) = 1.733$, $p < 0.0001$; $F_{\text{treatment}}(4, 692) = 45.51$, $p < 0.0001$; $F_{\text{days}}(28, 692) = 6.071$, $p < 0.0001$]

5.2.b Valutazione dell'espressione genica dei marcatori molecolari coinvolti nei circuiti fame/sazietà

A livello ipotalamico, sede dei centri fame/sazietà, è stata valutata l'espressione di due neuropeptidi anoressigeni: la Prooppiomelanocortina (POMC) e la Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), e di due neuropeptidi oressigeni: il Neuropeptide Y (NPY) e la Agouti related peptide (AgRP).

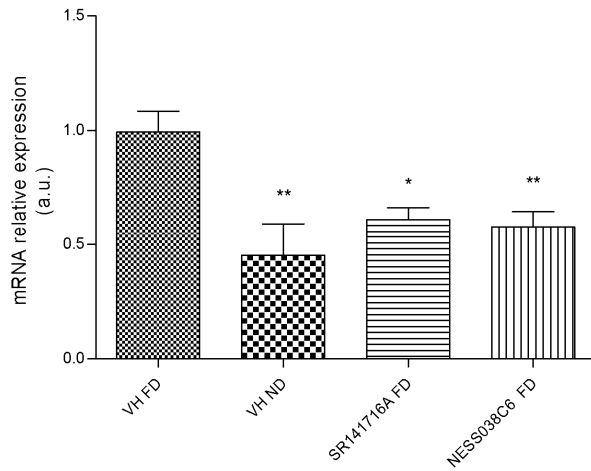
E' stata inoltre valutata l'espressione del recettore dei cannabinoidi 1 (CB1), del recettore della leptina (LEP-R) e del recettore dell'insulina (INS-R), coinvolti nei circuiti centrali della fame/sazietà.

L'espressione di leptina e adiponectina è stata valutata nel grasso viscerale.

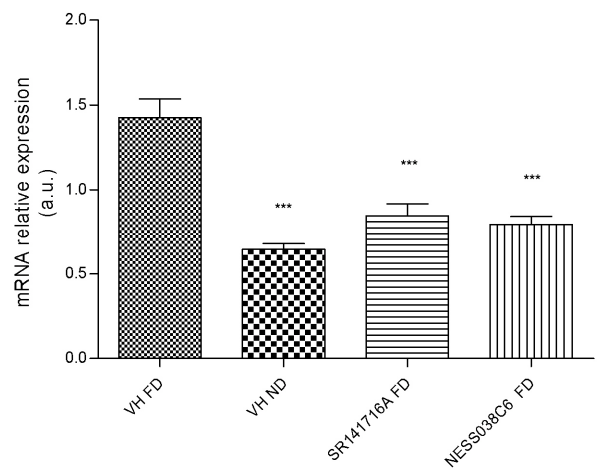
Neuropeptidi anoressigeni

Per quanto riguarda l'espressione dei peptidi anoressigeni POMC e CART, sia il trattamento farmacologico che lo switch di dieta generano un decremento dell'espressione dell'mRNA dei due marcatori anoressizzanti. Questa diminuzione, come si evince dai grafici di seguito riportati, è più marcata e statisticamente significativa nel CART (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs VHFD).

POMC



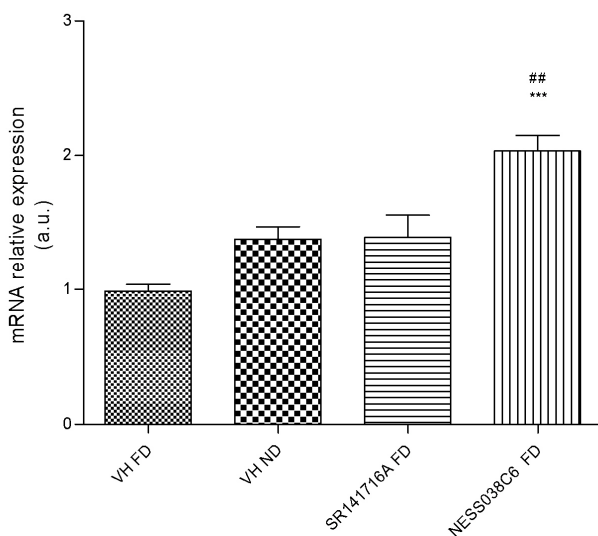
CART



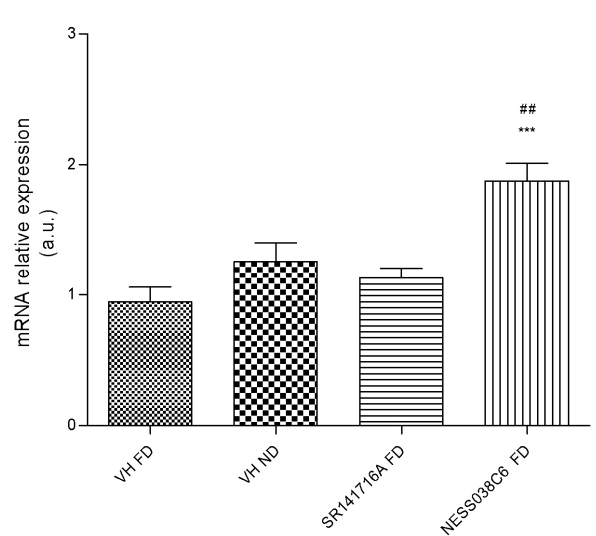
Neuropeptidi oressigeni

Nella figura seguente si può evidenziare come l'azione del composto NESS038C6 determini un incremento statisticamente significativo dell'mRNA dei due modulatori oressizzanti AgRP e NPY (** $p < 0.001$ vs VHFD, ## $p < 0.01$ vs VHND). L'azione sull'espressione genica di questo nuovo composto è superiore rispetto al composto di riferimento, l'SR141716A.

AgRP

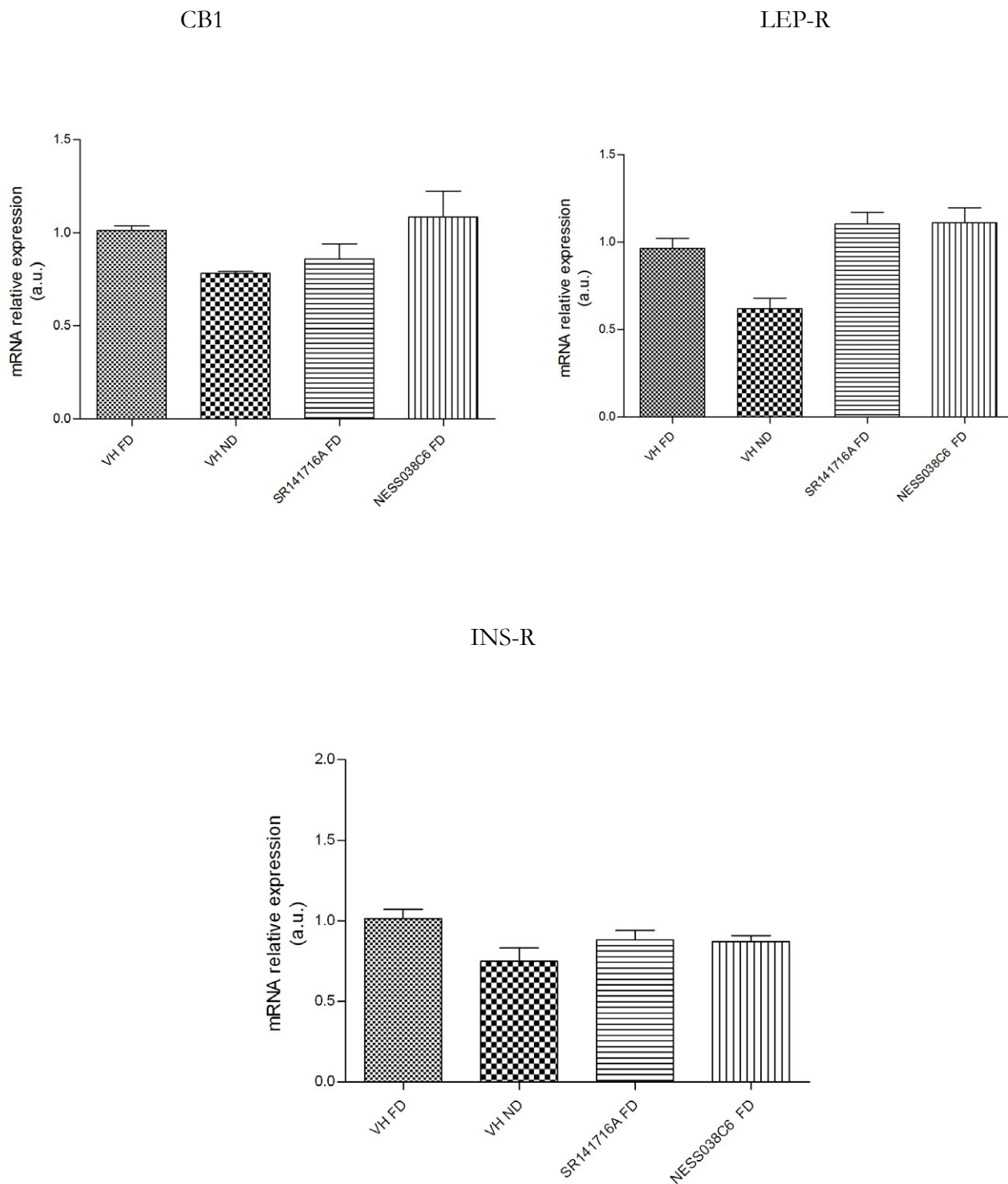


NPY



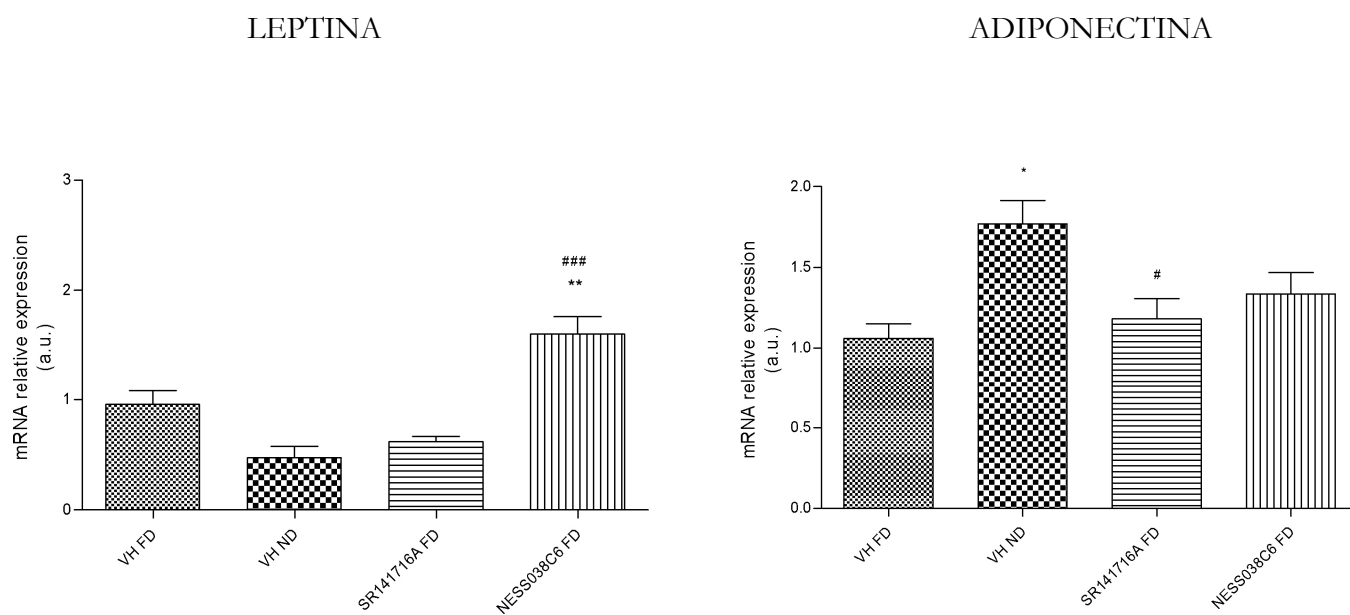
Recettore CB1, recettore della leptina, recettore dell'insulina nell'ipotalamo

Sono di seguito riportati i grafici relativi all'espressione del recettore CB1, del recettore della leptina e del recettore dell'insulina nell'ipotalamo. Le figure mostrano come l'espressione dell'mRNA dei recettori centrali non cambi tra i diversi gruppi sperimentali.



Espressione di leptina e adiponectina nel grasso viscerale

La figura seguente evidenzia un significativo incremento dell'espressione della leptina nel gruppo sperimentale trattato con NESS038C6 (** $p < 0.01$, ### $p < 0.01$) rispetto al veicolo FD e al VHND. Quest'andamento non si osserva nell'adiponectina, per la quale l'unica differenza statisticamente significativa si riscontra tra i due veicoli ND *vs* FD (* $p < 0.05$).

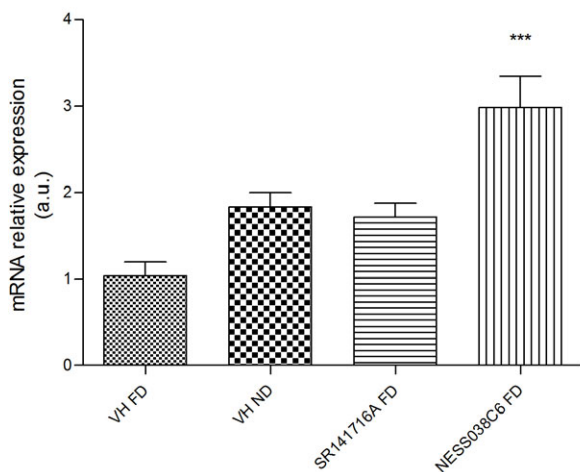


5.2.c Valutazione dell'espressione genica dei marcatori molecolari coinvolti nei circuiti gratificazione/piacere

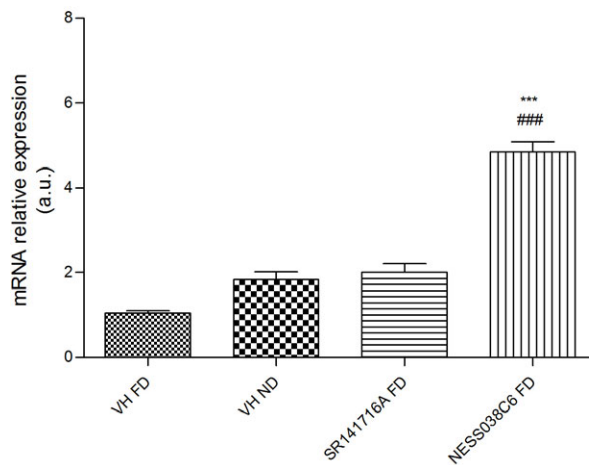
Sono di seguito riportati i grafici relativi alla valutazione dell'espressione genica dei marcatori molecolari coinvolti nei circuiti gratificazione/piacere. Il composto di riferimento SR141716A, antagonista CB1, non determina significative variazioni nell'espressione genica dei marcatori studiati rispetto al veicolo, confermando una tendenza inibitoria sui mediatori del circuito della gratificazione e del piacere. Il composto di nuova sintesi NESS038C6 presenta al contrario un profilo significativamente differente rispetto al veicolo e al Rimonabant. In particolare è interessante notare il suo effetto positivo sull'espressione del DAT, NAT e del BDNF, agente neurotrofico del sistema nervoso centrale.

Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nell'amigdala

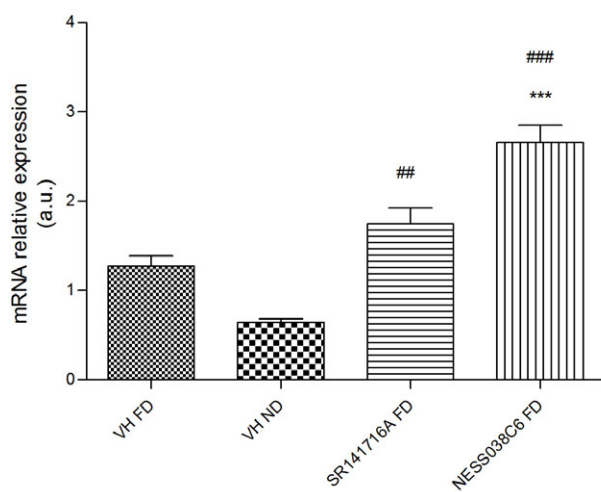
DAT



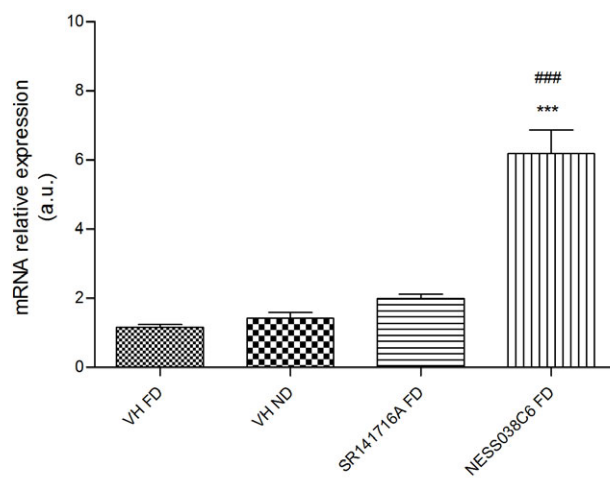
NAT



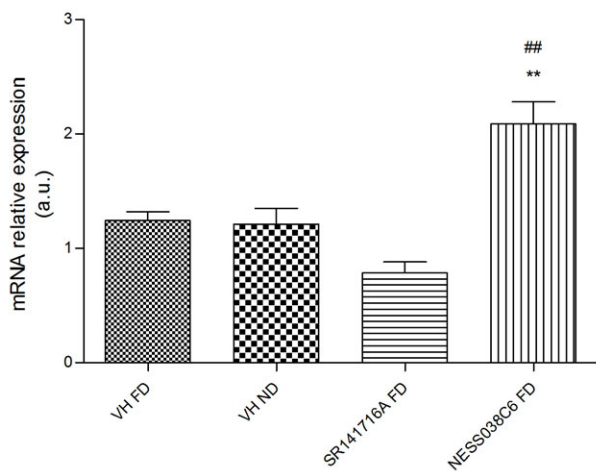
SERT



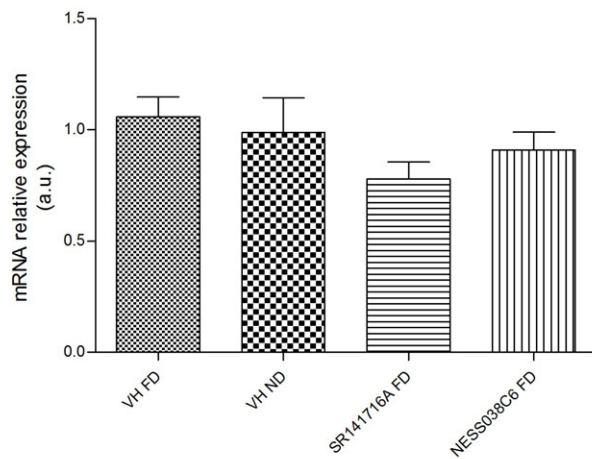
DBH



BDNF

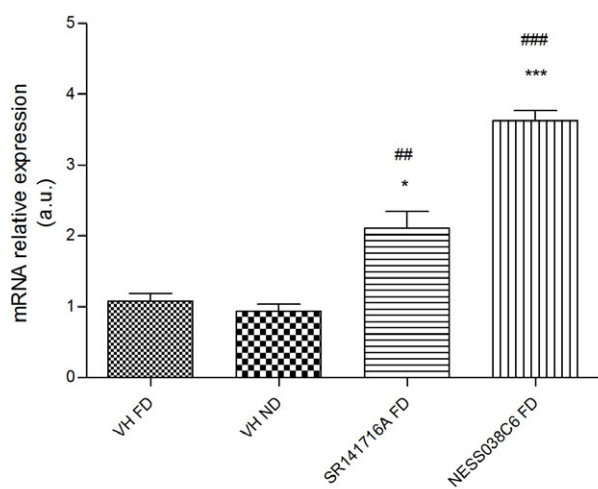


CREB 1

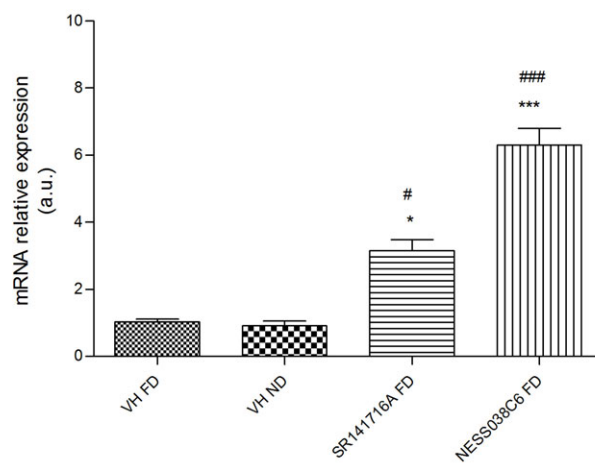


Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nell'ippocampo

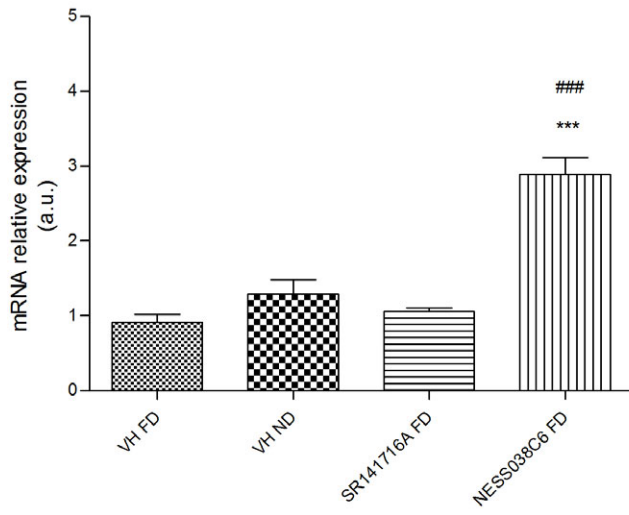
DAT



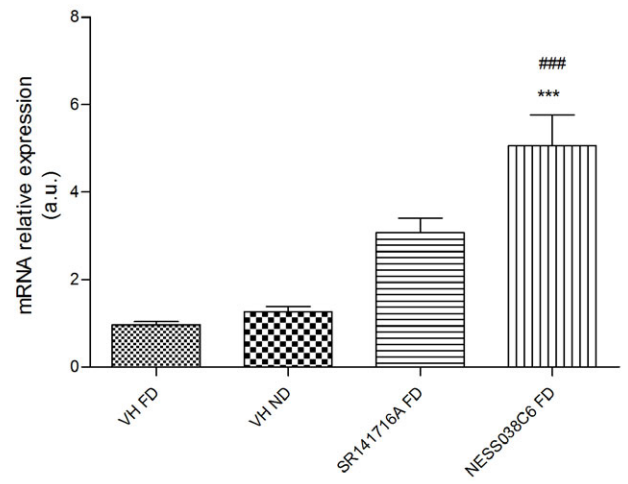
NAT



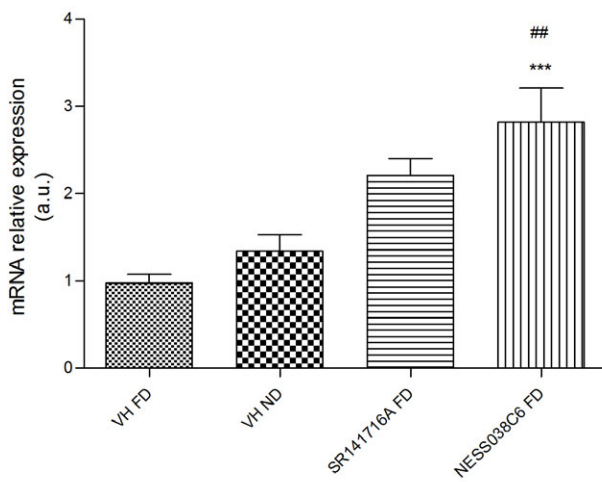
SERT



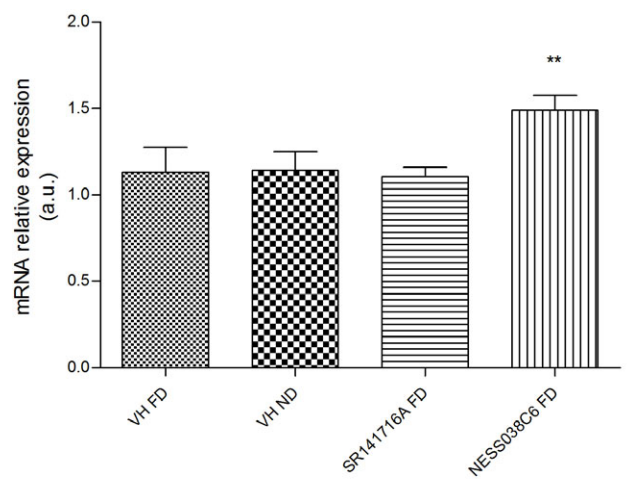
DBH



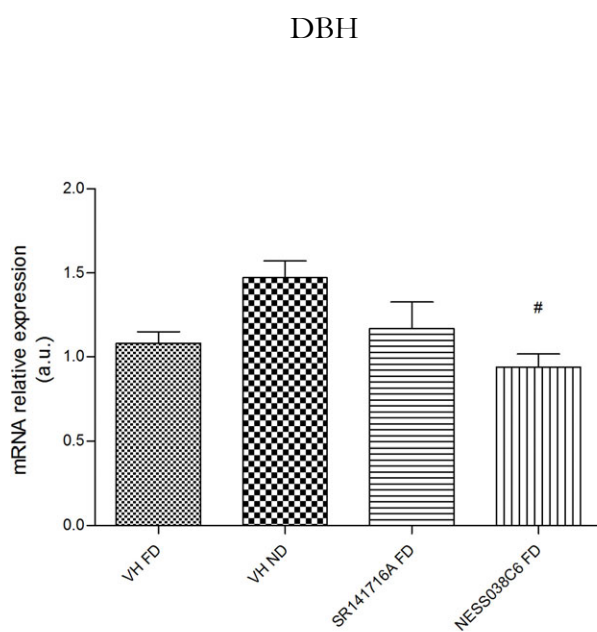
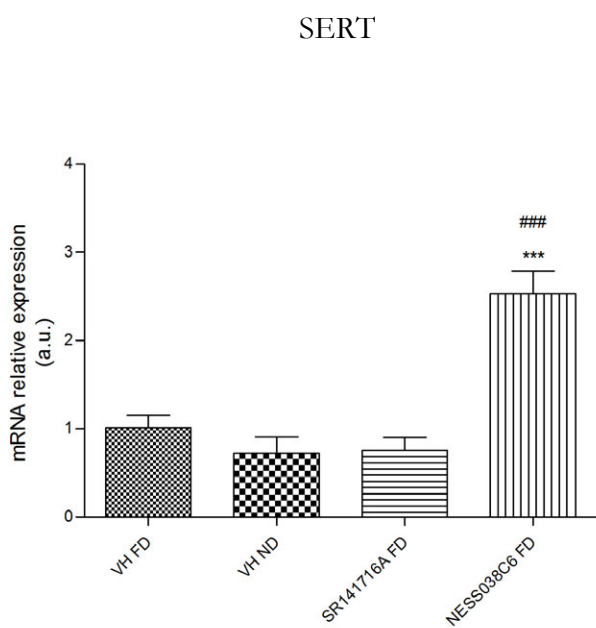
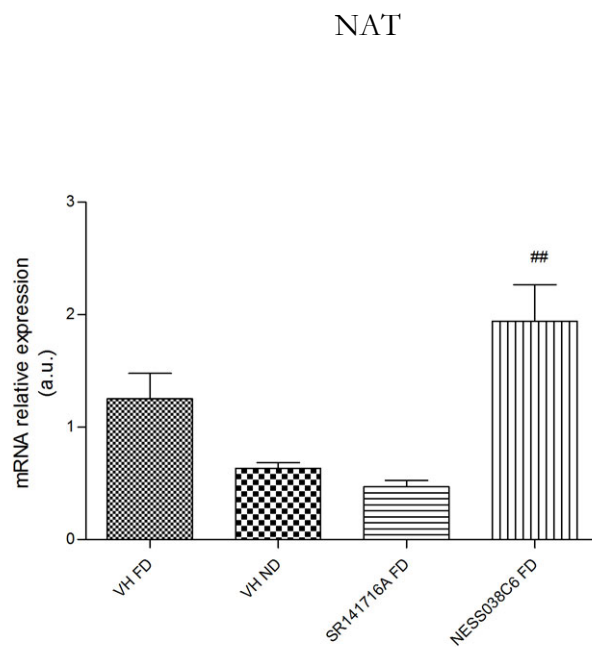
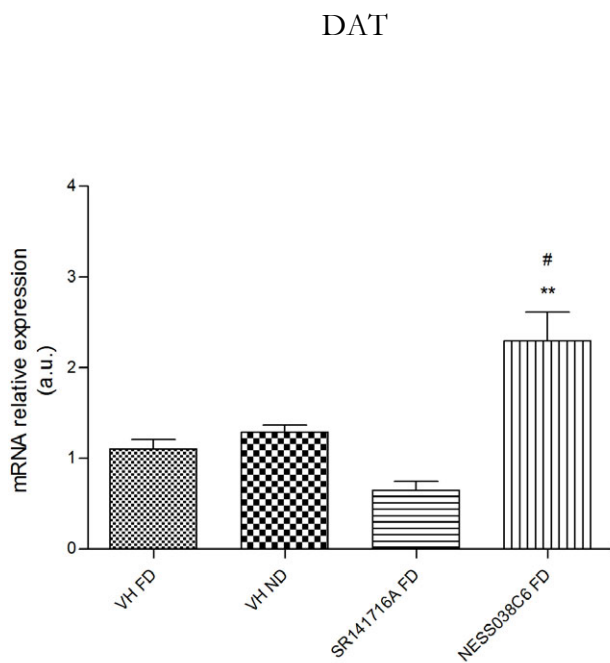
BDNF



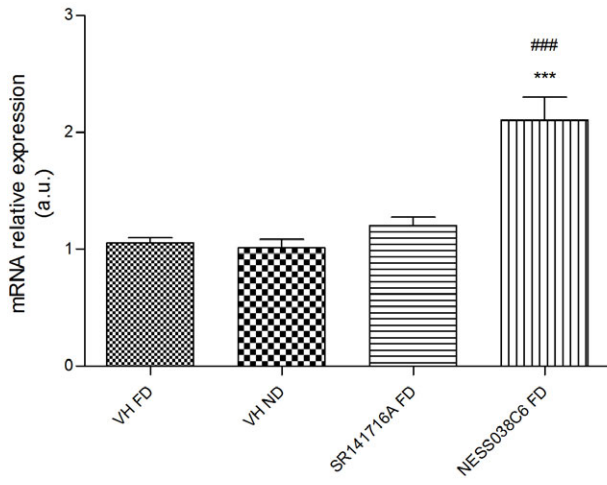
CREB 1



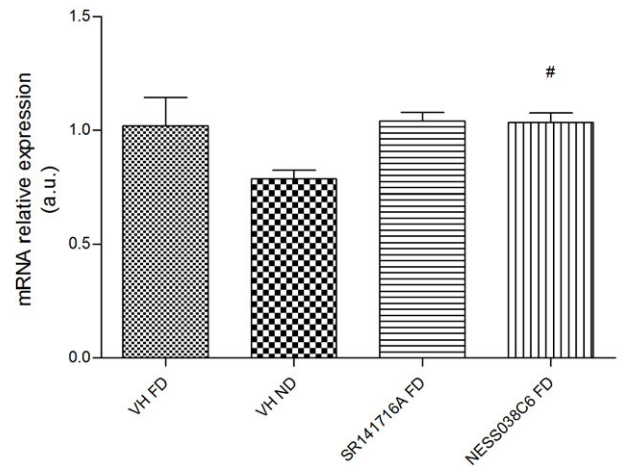
Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nella corteccia prefrontale



BDNF

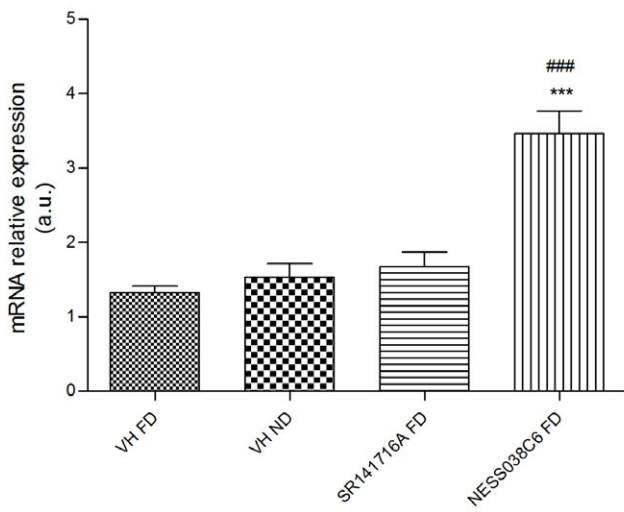


CREB 1

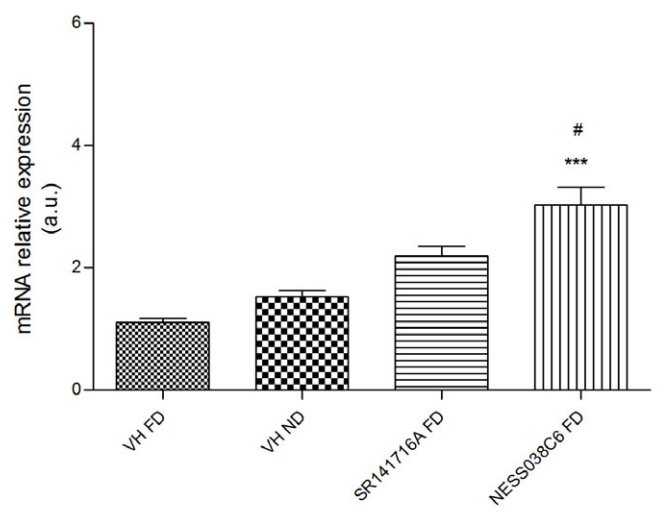


Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nel nucleus accumbens

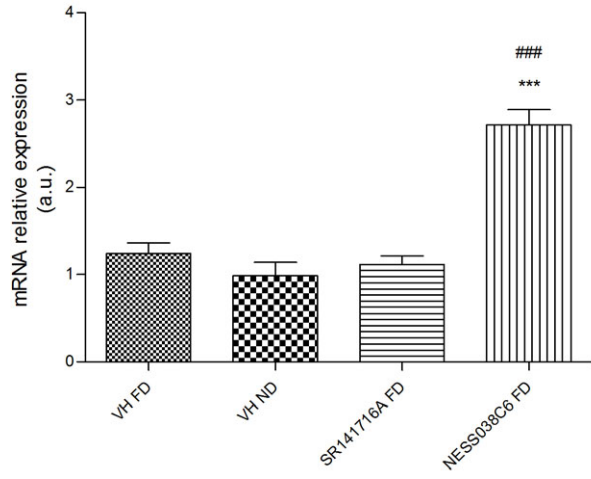
DAT



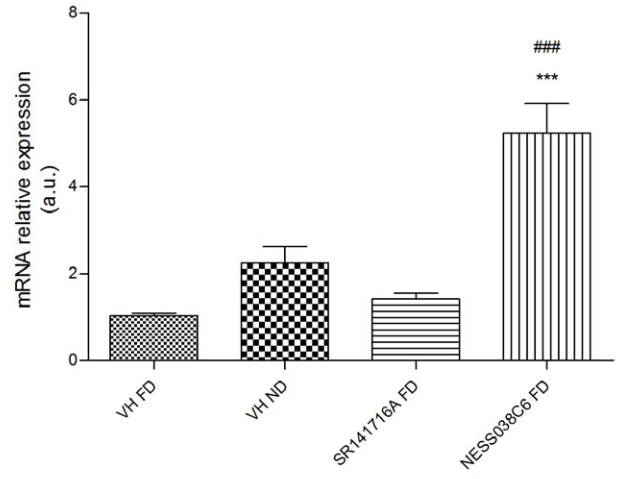
NAT



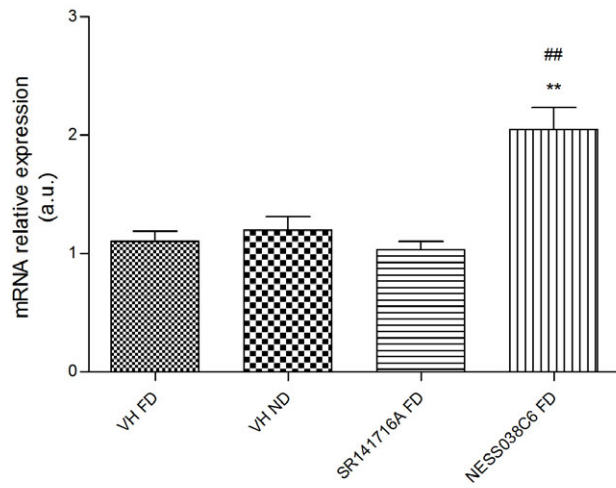
SERT



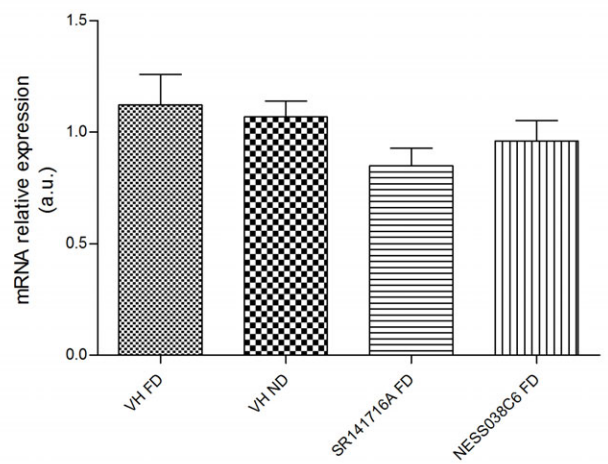
DBH



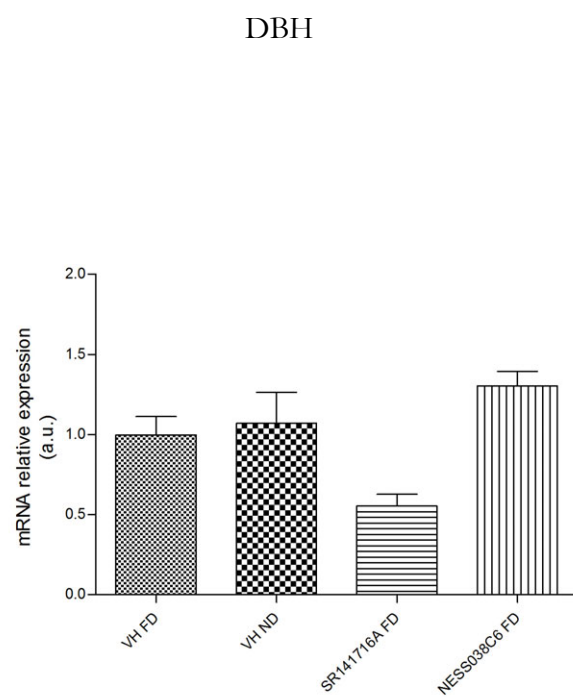
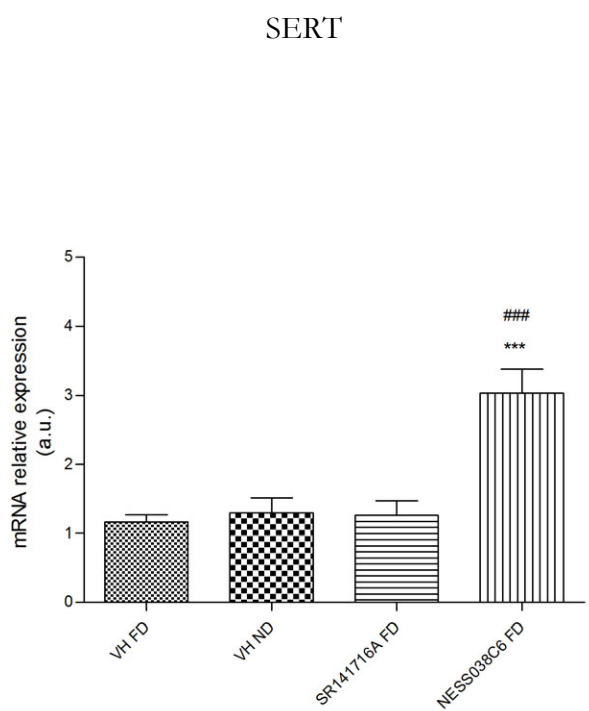
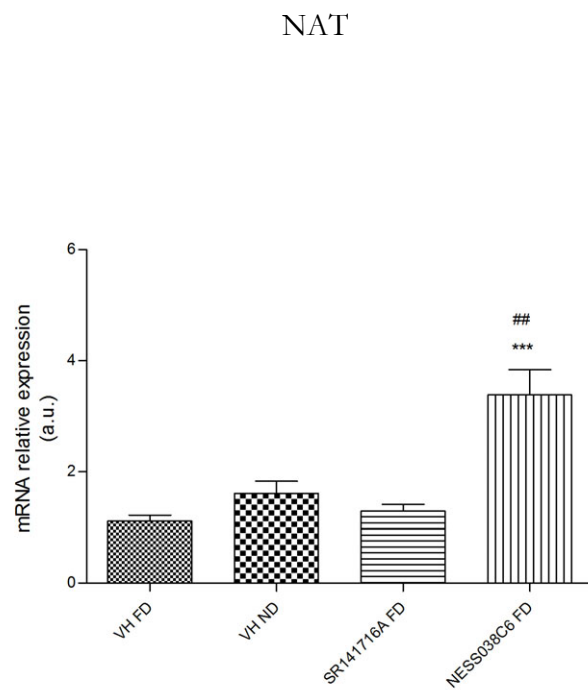
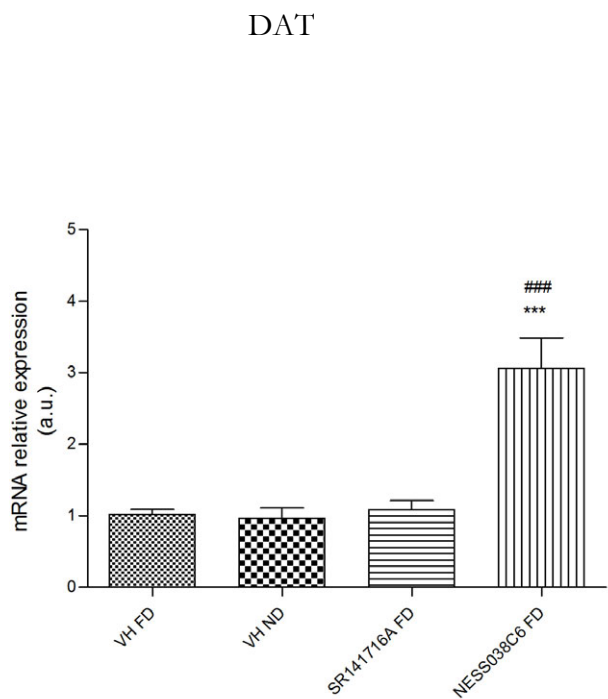
BDNF



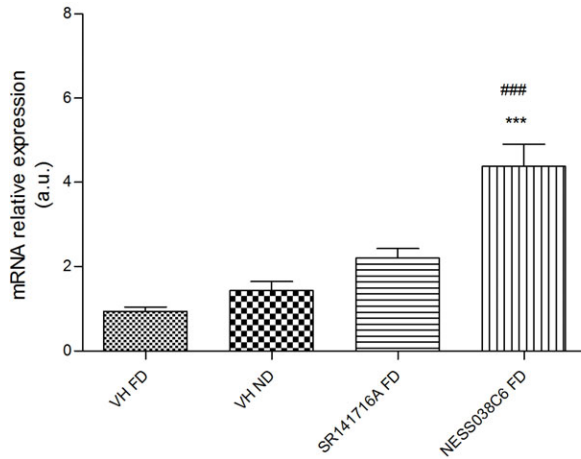
CREB 1



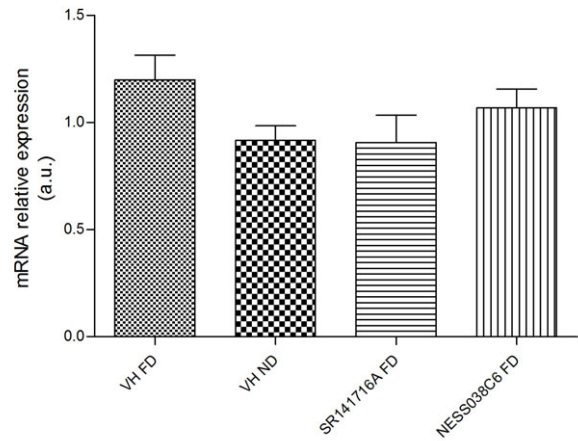
Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nello striato



BDNF



CREB 1

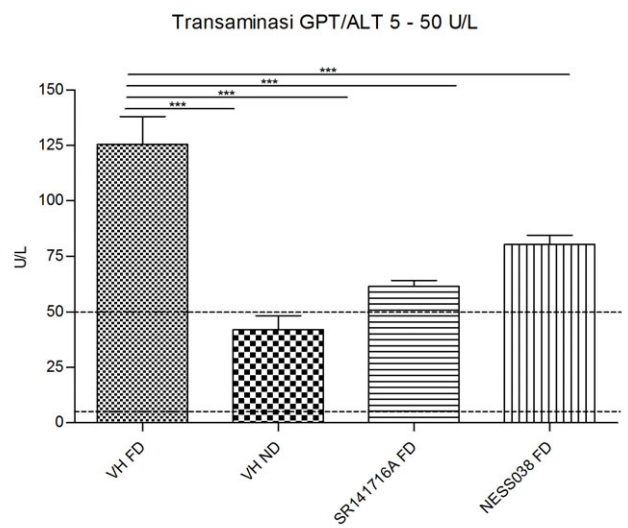
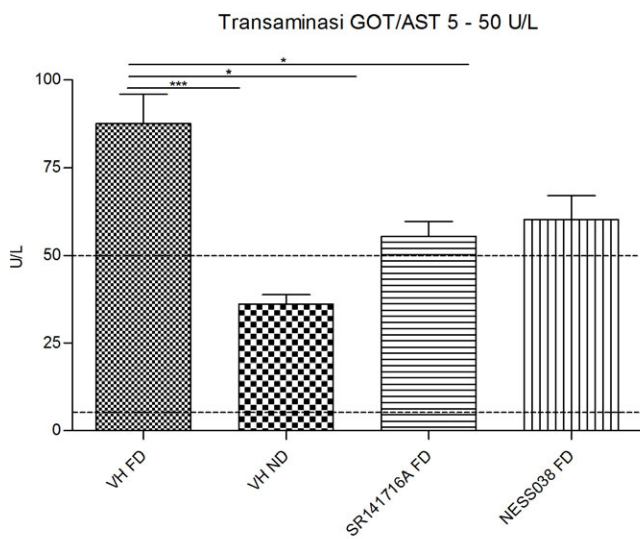
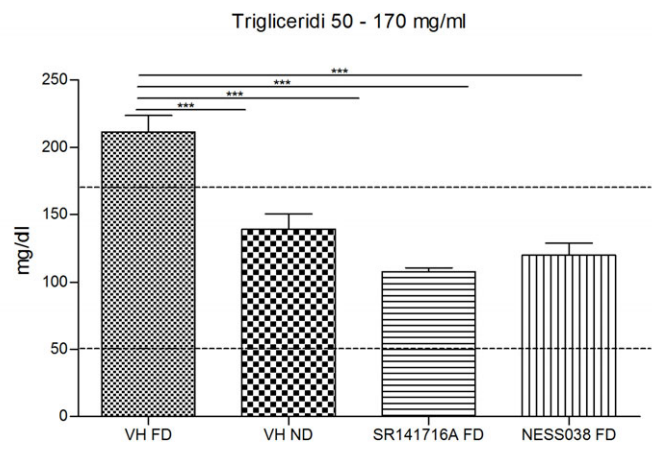
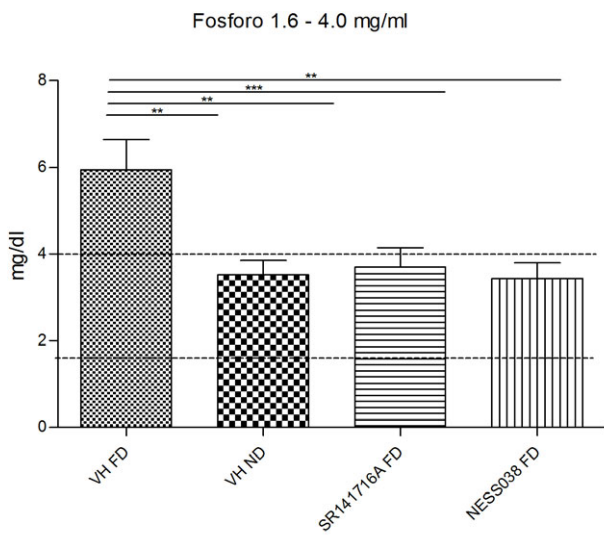
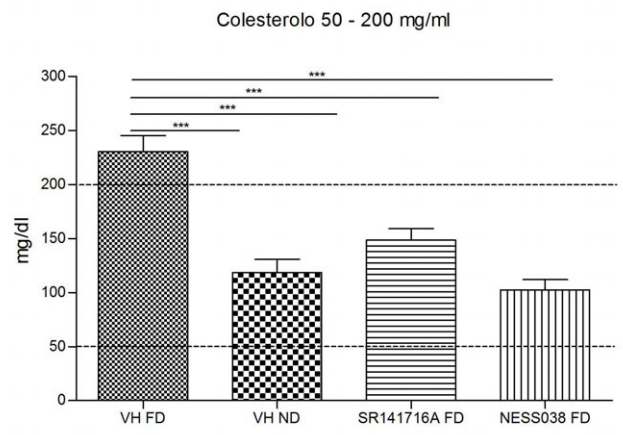
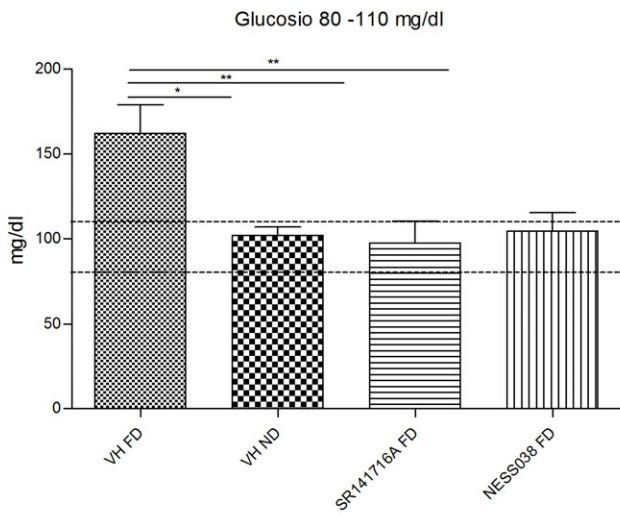


5.2.d Valutazione dei dati emato-chimici

La regolazione dell'espressione dei modulatori dei pathways molecolari fame-sazietà si completa con i dati emato-chimici ottenuti sugli stessi campioni su cui è stata effettuata l'analisi molecolare. I grafici di seguito riportati si riferiscono ai risultati dell'analisi emato-chimica di parametri quali glucosio, trigliceridi, colesterolo totale, transaminasi ALT e GPT, effettuata su tali campioni a fine trattamento cronico.

Dai dati ematici si evidenzia come una dieta ipercalorica cronica porti ad un assetto emato-chimico alterato. Il trattamento cronico con i composti utilizzati e lo switch di dieta riporta ai livelli fisiologici colesterolo, trigliceridi e fosforo, il cui aumento è strettamente correlato con disturbi cardio-vascolari. I livelli di glucosio rientrano nella norma. I dati sulle transaminasi mostrano invece una sofferenza epatica, con valori elevati di entrambi gli enzimi in tutti i gruppi trattati.

I valori di riferimento corrispondono ai valori basali stabiliti con lo strumento utilizzato (KeyLab, Biosed) per la specie animale studiata.



6. Discussione e conclusioni

Nel presente studio ho descritto gli effetti sulla regolazione del peso corporeo e del comportamento alimentare di un nuovo composto antagonista del recettore CB1, il NESS038C6, in modelli non genetici di obesità (topi DIO). Inoltre, attraverso l'analisi dell'espressione genica, ho contribuito a delucidare il meccanismo d'azione alla base degli effetti osservati conseguenti al blocco del recettore CB1.

L'ipofagia indotta in acuto dal SR141716A è stata ampiamente descritta in diversi modelli animali di roditori e di primati (Di Marzo et al., 2001; Colombo et al., 1998; Simiand et al., 1998). Il presente lavoro conferma l'effetto acuto del SR141716A nel modello di topi DIO, e mostra la capacità del nuovo composto NESS038C6 di indurre un effetto del tutto comparabile a quello del farmaco di riferimento seppur con una minore potenza. E' stato suggerito che l'effetto anoressizzante dipenda da una ridotta motivazione all'alimentazione e che possa coinvolgere i circuiti del *reward* (Thornton-Jones et al., 2005; Cota et al., 2003). In tutti i modelli di esposizione cronica, si instaura tolleranza all'effetto ipofagico del SR141716A dopo alcuni giorni di trattamento, mentre permane l'effetto sulla diminuzione del peso corporeo fino al raggiungimento del peso normale per il ceppo considerato (Thornton-Jones et al., 2006; Jbilo et al., 2005; Poirier et al., 2005; Vickers et al., 2003).

Tra gli obiettivi principali del presente studio vi era quello di determinare se il nuovo ligando CB1 mostrasse un profilo simile a quello del SR141716A.

In tutti i modelli di esposizione cronica, dopo alcuni giorni di trattamento si instaura tolleranza all'effetto ipofagico del SR141716A, mentre permane l'effetto positivo sulla diminuzione del peso corporeo fino al raggiungimento del peso normale per il ceppo considerato (Thornton-Jones et al., 2006; Jbilo et al., 2005; Poirier et al., 2005; Vickers et al., 2003).

I dati sul consumo di cibo dimostrano che il NESS038C6 induce una diminuzione del consumo di cibo nei primi giorni di trattamento, e che rapidamente insorge tolleranza a tale effetto anoressizzante in maniera del tutto simile al SR141716A. Inoltre, il trattamento cronico col NESS038C6 determina una riduzione del peso corporeo simile a quella del SR141716A, ed entrambi i composti mostrano su questo parametro la stessa efficacia di una dieta normocalorica. Questi dati supportano l'ipotesi che l'effetto sul peso corporeo indotto dal blocco del recettore CB1 sia dovuto solo inizialmente a un minore introito energetico, e che sia progressivamente associato al fatto che gli antagonisti CB1 possano influenzare il dispendio energetico e il metabolismo in siti di azione centrali e periferici (Poirier et al., 2005; Bensaid et al., 2003).

Alla luce di queste evidenze, con il presente studio ho analizzato il profilo di espressione di diversi geni coinvolti nell'omeostasi energetica dopo un trattamento cronico con gli antagonisti CB1. Ho preso in considerazione l'ipotalamo, l'area del sistema nervoso centrale che presiede al controllo degli stimoli oressizzanti e anoressizzanti, e il tessuto adiposo, che agisce di concerto con i tessuti centrali per mantenere il peso corporeo entro i valori ottimali.

Il feedback esistente tra il tessuto adiposo e l'ipotalamo è mediato dalla leptina espressa dagli adipociti, strettamente correlata con i livelli sierici di insulina. Bassi livelli di insulina determinano un abbassamento dell'espressione della leptina, che portano nell'ipotalamo all'aumento dell'espressione dei peptidi oressizzanti AgRP e NPY tale da stimolare il *senso di fame*. Al contrario, il *senso di sazietà* è determinato dall'incremento nell'ipotalamo dell'espressione di neuropeptidi anoressizzanti (POMC e CART) in risposta all'aumento dei livelli di insulina e quindi di leptina nel sangue (Schwartz et al., 2000). Nell'obesità questo sistema non è più in equilibrio e si osserva spesso una pronunciata *tolleranza* alla leptina e all'insulina tale da non poter più comunicare il senso di sazietà all'ipotalamo. Risulta, quindi, alterata l'espressione dei modulatori oressigeni e anoressigenici ipotalamici.

Studi precedenti hanno focalizzato l'attenzione sull'espressione del gene per l'adiponectina, un'adipochina inversamente correlata al grado di adiposità la cui concentrazione plasmatica è diminuita in pazienti con obesità e diabete (Thornton-Jones et al., 2006; Weyer et al., 2001). Inoltre è stato osservato un aumento dell'espressione del recettore CB1 negli adipociti di ratti obesi Zucker rispetto alla loro controparte normopeso (Bensaid et al., 2003).

I dati di espressione genica, in linea con quanto osservato a livello comportamentale, mostrano un aumento dell'espressione dei peptidi oressizzanti e una diminuzione di quelli anoressizzanti nell'ipotalamo, in particolare nei gruppi sperimentali trattati con NESS038C6. In accordo con i miei dati, è stato descritto che l'espressione di questi due neuropeptidi nell'ipotalamo aumenta durante la deplezione delle riserve adipose e/o in conseguenza di un diminuito signaling della leptina e dell'insulina nel cervello (Schwartz et al., 2000; Sanacora et al., 1990).

Allo stesso tempo il tessuto adiposo, che diminuisce nettamente durante il trattamento farmacologico, dovrebbe far giungere all'ipotalamo sempre meno leptina e insulina, *sensibilizzandolo* a questi ormoni così da incrementare l'espressione dei relativi recettori. Questo però non succede. Si è infatti osservata l'assenza di differenze significative nell'espressione dell'mRNA dei recettori della leptina e dell'insulina tra i gruppi trattati e i veicoli.

Si osserva inoltre un aumento dell'espressione dell'mRNA della leptina nel tessuto adiposo, che dovrebbe incrementare l'espressione dei neuropeptidi anoressizzanti ipotalamici generando il senso di sazietà. Questo dato non coincide, come detto, con i dati sul consumo di cibo, e può essere spiegato da una dicotomia tra i livelli sierici di leptina e quelli registrati a livello di mRNA.

Si può ipotizzare che a livello ipotalamico ci siano ancora bassi livelli di leptina tali da incrementare l'espressione dei peptidi oressizzanti, che spingono quindi gli animali a mangiare.

I dati ottenuti mettono in luce come l'azione sui circuiti della fame sazietà sia molto complessa. Esiste indubbiamente un sistema di regolazione a livello centrale, ma l'assenza di differenze nell'espressione dei recettori ipotalamici di leptina e insulina fanno pensare all'esistenza di vie parallele operanti anche sul metabolismo basale e sulla termogenesi, che spingono ad ampliare il set di parametri utili per validare l'effetto antiobesità di questi nuovi composti.

Lo studio dell'espressione genica è stato eseguito alla fine del trattamento cronico, quando si era già instaurata la tolleranza all'effetto anoressizzante dei farmaci e gli animali trattati avevano raggiunto un peso corporeo stabile. Questo mi ha permesso di delucidare maggiormente i meccanismi molecolari e il signaling tra SNC e periferia necessari per mantenere un'adeguata omeostasi energetica.

Ho infine ritenuto necessario studiare l'azione del composto di nuova sintesi NESS038C6 nel sistema mesolimbico, responsabile dei meccanismi del piacere e della gratificazione, dal momento che il Rimonabant è stato ritirato dal commercio a causa dei gravi effetti collaterali mostrati quali ansia, depressione e disturbi neurologici.

A tal fine, mediante l'analisi dell'espressione genica del trasportatore (SERT) ho valutato l'alterazione dell'attività serotoninergica. Ho determinato le modificazioni relative ai sistemi di trasmissione della noradrenalina e dopamina attraverso lo studio dell'espressione dei relativi trasportatori, NAT e DAT. Questi dati sui trasportatori e relativi recettori sono stati integrati con la valutazione dell'espressione dell'enzima DBH (dopamina beta idrossilasi), responsabile della conversione della dopamina a noradrenalina, e del fattore di trascrizione CREB. Le alterazioni ai processi di plasticità e neurogenesi sono state valutate con lo studio dell'espressione del fattore trofico BDNF.

E' infatti noto dalla letteratura come la depressione sia associata a diversi meccanismi quali: la diminuzione dei livelli corticali delle amine biogene, in particolare serotonina; alterazioni nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule dell'ippocampo e nei livelli dell'agente neurotrofico del sistema nervoso centrale BDNF; e variazioni nei livelli di citochine nel sistema nervoso centrale (SNC). Per quanto riguarda l'interazione tra il sistema serotoninergico e quello cannabinoidergico, la serotonina provoca il rilascio di endocannabinoidi dai neuroni (Best e Regehr, 2008) e, viceversa, gli endocannabinoidi aumentano i livelli di serotonina (Bambico et al., 2009).

Allo stesso modo è stato stabilito un collegamento tra il sistema endocannabinoide, il BDNF e la neurogenesi, con la regolazione da parte del BDNF della sensibilità neuronale verso gli endocannabinoidi (Beyer et al., 2010; Marchalant et al., 2009; Christensen et al., 2007; Mitchell

and Morris, 2007; Steinberg et al., 2007). Diversi studi hanno indagato il ruolo del sistema cannabinoide nella neurogenesi adulta, constatando che la stimolazione dei recettori CB1 sembra aumentare o diminuire la neurogenesi nell'adulto (Aguado et al., 2006; Aguado et al., 2005). Ad esempio in topi adulti con deficit di CB1, la proliferazione delle cellule progenitrici neurali è diminuita. Inoltre, gli endocannabinoidi controllano il differenziamento neurale delle progenitrici nel cervello adulto, promuovendo la differenziazione astrogliale delle cellule appena nate (Aguado et al., 2006). Rueda et al. hanno invece dimostrato che l'endocannabinoide anandamide inibisce il differenziamento delle cellule progenitrici neuronali attraverso l'attenuazione del segnale extracellulare regolamentato pathway della chinasi in vitro, e che la neurogenesi adulta nel giro dentato è significativamente diminuita dall'analogo dell'anandamide methanandamide e aumentata dall'antagonista CB1 SR141716A (Rueda et al., 2002). La confusione che emerge confrontando gli studi potrebbe essere spiegata dalle differenze nel disegno sperimentale, nelle sostanze utilizzate, nel sesso degli animali, nella durata della sperimentazione, e nei parametri di lettura per la "neurogenesi adulta" (Wolf et al., 2010).

Alla luce di quanto detto, i dati ottenuti mettono in luce alcune caratteristiche interessanti del NESS038C6 in tutti i distretti del sistema mesolimbico. In particolare è da sottolineare il suo effetto positivo sull'espressione di DAT, NAT e soprattutto del BDNF. L'analisi molecolare dei mediatori del piacere e della gratificazione evidenzia come il NESS038C6 presenti un profilo ideale come farmaco antiobesità, senza compromettere le funzionalità del sistema mesolimbico. Si ritengono comunque necessari ulteriori approfondimenti comportamentali al fine di escludere *in vivo* qualsiasi risposta depressivo-simile.

Dai dati ematici si evidenzia come una dieta ipercalorica *cronica* porti ad un generale alterato assetto emato-chimico. Il trattamento cronico con i composti utilizzati e lo switch di dieta riporta a livelli fisiologici colesterolo, trigliceridi e fosforo, il cui aumento è strettamente correlato con disturbi cardio-vascolari. I livelli di glucosio rientrano nella norma. I dati sulle transaminasi mostrano invece una *sofferenza* epatica dimostrata dai valori elevati di entrambi gli enzimi in tutti i gruppi trattati. Questo dato confermerebbe quindi come una dieta ipercalorica determini un evidente danno epatico, che viene riportato a condizioni fisiologiche solo da una dieta normocalorica.

In conclusione, questo studio descrive il potenziale anti-obesità di un nuovo composto antagonista CB1 in un modello acuto e cronico di obesità. Inoltre, descrive alcuni meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione del peso corporeo e del comportamento alimentare indotti dagli antagonisti cannabinoidegici, sottolineando le differenze con il composto di riferimento e con il passaggio ad una dieta normocalorica.

Questi dati indicano il NESS038C6 come un possibile candidato per uno sviluppo farmacologico in quanto non solo conferma quanto già osservato per altri ligandi cannabinoidergici, ma possiede differenze nel profilo farmacodinamico. Il composto inoltre non compromette le funzionalità del sistema mesolimbico.

Questi dati preclinici contribuiscono a chiarire le alterazioni molecolari dell'omeostasi energetica allo scopo di definire nuovi bersagli farmacologici per potere intervenire sull'obesità sia mediante le modificazioni dello stile di vita che con l'ausilio di specifici trattamenti farmacologici.

7. Referenze bibliografiche

1. Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2005 Oct;19(12):1704-6
2. Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci.* 2006 Feb 1;26(5):1551-61
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006 May;23(5):469-80
4. Bambico FR, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Gobbi G. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr Pharm Des.* 2009;15(14):1623-46
5. Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 2003 Apr;63(4):908-14
6. Best AR, Regehr WG. Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci.* 2008 Jun 18;28(25):6508-15
7. Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, Chan K, Manners MT, Samad TA, Kennedy JD, Bingham B, Whiteside GT. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis.* 2010 Aug;39(2):148-55
8. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5
9. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup AV. [A meta-analysis of the efficacy and safety of the anti-obesity agent Rimonabant]. *Ugeskr Laeger.* 2007 Dec 10;169(50):4360-3
10. Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 1998;63(8):PL113-7
11. Coonse KG, Coonts AJ, Morrison EV, Heggland SJ. Cadmium induces apoptosis in the human osteoblast-like cell line Saos-2. *J Toxicol Environ Health A.* 2007 Apr 1;70(7):575-81
12. Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Mar;27(3):289-301

13. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9
14. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járαι Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):822-5
15. Fabricatore AN, Wadden TA. Obesity. *Annu Rev Clin Psychol*. 2006;2:357-77
16. Field BC, Chaudhri OB, Bloom SR. Obesity treatment: novel peripheral targets. *Br J Clin Pharmacol*. 2009 Dec;68(6):830-43
17. Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*. 2009 Apr 10;159(4):1193-9
18. Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, Pénarier G, Soubrié P, Le Fur G, Galiègue S, Casellas P. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J*. 2005 Sep;19(11):1567-9
19. Kushner RF. Obesity management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007 Mar;36(1):191-210
20. Lazzari P, Sanna A, Mastinu A, Cabasino S, Manca I, Pani L. Weight loss induced by rimonabant is associated with an altered leptin expression and hypothalamic leptin signaling in diet-induced obese mice. *Behav Brain Res*. 2011 Mar 1;217(2):432-8
21. Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Feb;29(2):183-7
22. Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL. Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain. *Mol Psychiatry*. 2009 Dec;14(12):1068-9
23. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):179-85
24. Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, Johnson MR, Melvin LS, Mechoulam R, Ward SJ. Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Nov;40(3):471-8
25. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002 Jul;192(1):1-15
26. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Jan-Feb;18(1):27-37

27. Mitchell PB, Morris MJ. Depression and anxiety with rimonabant. *Lancet*. 2007 Nov 17;370(9600):1671-2
28. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006 Sep 21;443(7109):289-95
29. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):61-5
30. Murineddu G, Lazzari P, Ruiu S, Sanna A, Loriga G, Manca I, Falzoi M, Dessì C, Curzu MM, Chelucci G, Pani L, Pinna GA. Tricyclic pyrazoles. 4. Synthesis and biological evaluation of analogues of the robust and selective CB2 cannabinoid ligand 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-piperidin-1-yl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide. *J Med Chem*. 2006 Dec 14;49(25):7502-12
31. Nestler, E.J., Hyman, E.S., Singh, J. and Malenka, R.C. Gordon, K.G., Bedell, J., and Reed, V. (2001) *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. New York: McGraw-Hill
32. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*. 1954 Dec;47(6):419-27
33. Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico - Obesity and the economics of prevention: fit not fat, 2010. Paris, France: OCSE
34. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):71-7
35. Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R, Fisiopatologia del sistema endocannabinoide: focus sul metabolismo. *Il diabete* 2006; 18: 1 – 10
36. Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R. Il sistema endocannabinoide e il controllo del metabolismo energetico: fisiologia e fisiopatologia. *G Ital Cardiol* 2008; 9 (Suppl 1-4): 74S-82S
37. Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P, Herbert JM. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab*. 2005 Jan;7(1):65-72
38. Rawls SM, Cowan A, Tallarida RJ, Geller EB, Adler MW. N-methyl-D-aspartate antagonists and WIN 55212-2 [4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1-i,]quinolin-6-one], a cannabinoid agonist, interact to produce synergistic hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Oct;303(1):395-402
39. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*. 1994 Aug 22;350(2-3):240-4

40. Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD. Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology*. 1990 Aug;127(2):730-7
41. Sargent BJ, Moore NA. New central targets for the treatment of obesity. *Br J Clin Pharmacol*. 2009 Dec;68(6):852-60
42. Schwartz M.W., Central nervous system regulation of food intake, *Obesity*. (Silver. Spring), 14 Suppl 1 (2006) 1S-8S
43. Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr., Seeley R.J., and Baskin D.G., Central nervous system control of food intake, *Nature*, 404 (2000) 661-671
44. Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrié P. SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav Pharmacol*. 1998 Mar;9(2):179-81
45. Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jul;270(1):219-27
46. Steinberg BA, Cannon CP. Cannabinoid-1 receptor blockade in cardiometabolic risk reduction: safety, tolerability, and therapeutic potential. *Am J Cardiol*. 2007 Dec 17;100(12A):27P-32P
47. Teitelbaum P and Stellar E. Recovery from the failure to eat, produced by hypothalamic lesions. *Science*. 1954 Nov 26; 120(3126): 894-895
48. Thornton-Jones ZD, Kennett GA, Benwell KR, Revell DF, Misra A, Sellwood DM, Vickers SP, Clifton PG. The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Jun;84(2):353-9
49. Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Nov;14(9):398-403
50. Vemuri VK, Janero DR, Makriyannis A. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: drugs for obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav*. 2008 Mar 18;93(4-5):671-86
51. Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A, Dourish CT, Kennett GA. Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Apr;167(1):103-11
52. Wanderley EN, Ferreira VA. [Obesity: a plural perspective]. *Cien Saude Colet*. 2010 Jan;15(1):185-94

53. Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet*. 2001 Feb 3;357(9253):354-7
54. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):1930-5
55. Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, Müller A, Melnik A, Waltinger TP, Ullrich O, Kempermann G. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal*. 2010 Jun 17;8:12
56. World Health Org. 2002. *The World Health Report 2002*. Geneva, Switzerland: WHO