



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA**

NEUROSCIENZE

Ciclo XXVI

**TITOLO TESI**

NESS06SM, UN NUOVO APPROCCIO ALLA TERAPIA DELL'OBESITA'

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO14 - FARMACOLOGIA

Presentata da: Dott. Andrea Mastinu

Coordinatore Dottorato: Prof. Walter Fratta

Tutor/Relatore Prof. Walter Fratta

Esame finale anno accademico 2012 – 2013

## Indice

1. INTRODUZIONE.....	3
<b>1.1 L'obesità: storia cultura e società.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 L'obesità: fisiopatologia.....</b>	<b>9</b>
<i>1.2.1 Bilancio energetico e metabolismo.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2 Insulino resistenza.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3 Sindrome metabolica.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.4 Il tessuto adiposo.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.5 Leptina e adiponectina.....</i>	<i>14</i>
<b>1.3 L'obesità: il sistema endocannabinoide.....</b>	<b>16</b>
<i>1.3.1 Il sistema endocannabinoide.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3.2 Signaling ipotalamici di fame e sazietà.....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.3 Signaling periferici: intestino.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3.4 Signaling periferici: tessuto adiposo.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.5 Signaling periferici: fegato.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.6 Le PPARs.....</i>	<i>24</i>
<b>1.4 L'obesità: terapia.....</b>	<b>25</b>
2. OBIETTIVO DELLA TESI.....	27
3. MATERIALI E METODI.....	28
<b>3.1 NESS06SM.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Rimonabant.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Attività intrinseca (<sup>35</sup>S)GTPγS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Attivazione recettoriale: Western Blot.....</b>	<b>32</b>

3.5 Tossicità <i>in vitro</i> .....	33
3.6 Attività <i>ex-vivo</i> .....	34
3.7 Permeabilità alla Barriera ematoencefalica: modelli <i>in silico</i> .....	35
3.8 Variazione delle temperatura corporea.....	36
3.9 Comportamento alimentare .....	37
3.10 Analisi ematiche.....	40
3.11 Espressione genica.....	40
3.12 Statistica.....	42
4. RISULTATI.....	42
4.1 Affinità, attività intrinseca e tossicità.....	42
4.2 Permeabilità.....	49
4.3 Variazione del peso corporeo, BMI e tessuto adiposo.....	50
4.4 Parametri ematici.....	54
4.5 Espressione genica nel tessuto adiposo e nel fegato.....	56
4.6 Espressione genica nell'ipotalamo.....	60
4.7 Espressione genica dei trasportatori delle monoamine.....	63
4.8 Espressione genica delle neurotrofine.....	66
5. DISCUSSIONE.....	68
6. CONCLUSIONI.....	76
7. BIBLIOGRAFIA.....	78
8. ELENCO PUBBLICAZIONI	

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 L'obesità: storia, cultura e società.

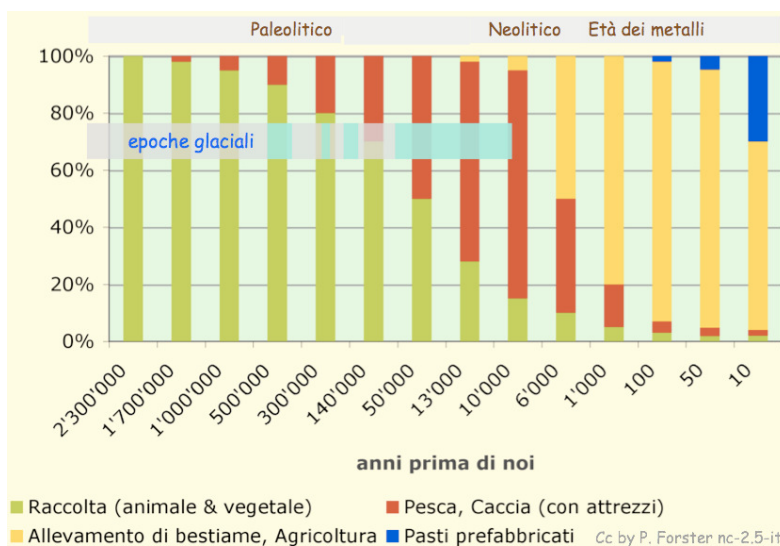
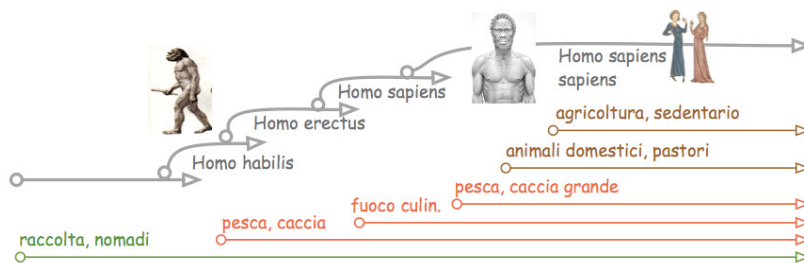
Nonostante oggi nel mondo 900 milioni di persone muoiono di fame, ne esistono circa 1 miliardo e mezzo affette da obesità [1], un numero che, come molte istituzioni politiche, sociali e sanitarie affermano, non tende ad arrestarsi [2]. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce l'obesità come una "patologia cronica caratterizzata da un eccesso di grasso corporeo che può causare problemi medici, psicologici, fisici, sociali ed economici" [2,3], e stima che oggi nel mondo vi siano circa 300 milioni di soggetti obesi [4].



*Venere di Willendorf. 23.000-19.000 a. c. h. cm 11. Roccia calcarea. Vienna, Museo di Storia Naturale.*

20.000 anni fa si è avuta un'ancestrale *rappresentazione* dell'obesità nelle prime società umane. Infatti, nonostante nel Paleolitico l'alimentazione e le condizioni di vita non portassero ad un patologico accumulo di grasso viscerale, la Venere di Willendorf può essere considerata la prima riproduzione artistica dell'obesità umana rappresentata da una donna senza volto con grandi mammelle pendule, fianchi abbondanti e natiche prominenti. La paleoantropologia ci spiega come

in realtà queste figure avessero significati rituali o religiosi da ricondurre alla fertilità [5]. Gli elementi anatomici erano distorti per dare all'opera un potere simbolico e spirituale. La vita nel Paleolitico era particolarmente difficile, e sicuramente l'apporto calorico non era sempre sufficiente, ai periodi di grossa caccia si susseguivano periodi rigidi dove era necessario risparmiare energie, consumando il poco grasso accumulato. La Venere di Willendorf esorcizza questa condizione precaria di 20.000 anni fa *celebrando* la bellezza delle forme rotondeggianti. Per diversi antropologi le origini dell'accumulo di grasso viscerale e poi dell'obesità, vanno ricollegate al passaggio della civiltà umana da società nomadi di caccia e raccolta a società più sedentarie, capaci di coltivare, cuocere i cibi, e da questi, ricavarne un apporto calorico maggiore [6], in particolare classi sociali più "alte".



*Evoluzione umana e approvvigionamento del cibo*

Nel corso della storia dell'uomo, infatti, alcuni biografi e medici di imperatori, di magistrati o di consoli [7] hanno raccontato alcuni degli effetti del sovrappeso e dell'obesità. Questa condizione patologica era legata soprattutto ai ceti più abbienti [8], che non svolgendo lavori manuali, e godendo degli agi della loro classe sociale andavano, incontro ad accumulo di grasso addominale.



*Coperchio di sarcofago del cosiddetto Obeso, prima metà III secolo a.C, Firenze, Museo Archeologico Nazionale*

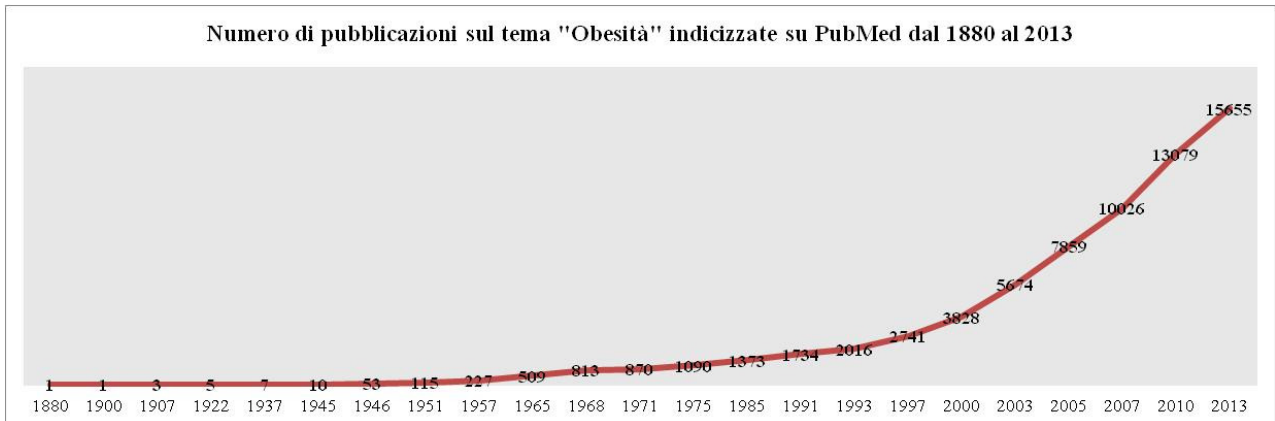
Infatti nonostante nella maggior parte della popolazione romana fossero presenti soprattutto individui sottopeso nel *De medicina* di Aulo Cornelio Celso [ref], medico romano ai tempi dell'imperatore Tiberio, c'è una frase molto significativa sulla condizione patologica dell'obeso: “*obesi plerumque acutis morbis et difficultate spirandi strangulantur*”; che corrisponde alla traduzione letterale: “Gli obesi sono perlopiù strangolati da morbi acuti e da difficoltà di respirare”. Come a dire, nell'ottica del tempo: l'obesità è una condizione corporea che predispone all'insorgenza repentina di mali quali scompenso cardiaco, ictus e da dispnea. Condizione patologica, l'obesità, ma anche simbolo culturale di prosperità, opulenza e potere. Questo valore culturale si trascinerà per tutta l'età moderna fino alla rivoluzione industriale e secondo dopoguerra [9].



*Juan Carreno De Miranda, Il mostro, 1680, El Prado, Madrid*

I primi lavori scientifici sugli aspetti prettamente patologici dell'obesità risalgono al 1880 [10], ma nel corso dei decenni continua ad aumentare l'interesse scientifico verso questa patologia cronica, generato da un continuo incremento del numero di obesi nei paesi occidentali soprattutto a partire dal secondo dopoguerra [11]. E' infatti dagli anni Cinquanta che si verifica su tutte le classi sociali un cambiamento della dieta verso regimi alimentari basati sulle proteine nobili [9]. Nei due decenni successivi il consumo di carne si attesta su livelli superiori alle razioni consigliate insieme al latte e ai formaggi [9]. In occidente così, spariscono su vasta scala patologie legate alla malnutrizione e alla povertà, ma inizia un veloce incremento di quelle legate all'alimentazione eccessiva [12]. Molti

epidemiologi sono infatti concordi nell'affermare che al maggior benessere alimentare si associa un'augmentata incidenza di malattie cardiovascolari e neoplastiche [12]. Le statistiche degli anni Sessanta e Settanta segnalano un incremento delle malattie cardio-cerebrovascolari, dei tumori gastro-enterici e del diabete [12].



L'uomo post-industriale vive in una società dove può accedere e consumare cibo con molta più facilità. Inoltre, l'organismo umano è fisiologicamente portato ad accumulare riserve energetiche sottoforma di grasso addominale, per contrastare potenziali periodi di carestia [13-15]. A ciò si deve aggiungere che le attività lavorative (anche legate al cibo, ma non solo) sono sempre più gestite dalle macchine, comportando così uno scarso consumo di energia fisica soprattutto nei paesi industrializzati. Tutto ciò porta ancora oggi all'eterna disuguaglianza nel mondo, dove, accanto a chi muore per scarsità di cibo e soffre di deficit proteico, calorico e vitaminico, c'è chi è tormentato dal problema opposto e si sottopone a diete snervanti e costose o a rischiosi interventi chirurgici per limitare i danni estetici e fisiologici della sovralimentazione e dell'obesità.

Concludendo quindi, nell'approcciarsi al problema dell'obesità non si può fare a meno di valutare le implicazioni etiche, sociali, culturali ed economiche che questo disturbo presenta, parallelamente a quelle fisiopatologiche che ora si andranno a considerare.

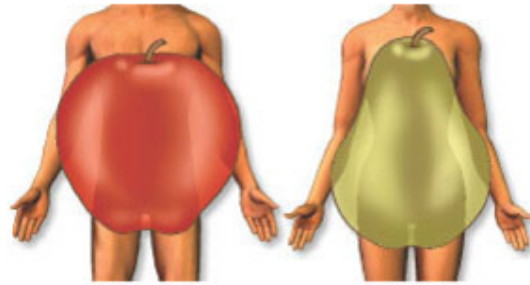


## 1.2 L'obesità: fisiopatologia

### 1.2.1 Bilancio energetico e metabolismo

Dietologi, nutrizionisti, diabetologi, medici di base e molti altri professionisti sanitari, hanno discusso a lungo su come e quando diagnosticare in un paziente l'obesità. Oggi si utilizza l'indice di massa corporea (body mass index, BMI) che esprime il rapporto del peso espresso in chilogrammi diviso il quadrato dell'altezza espressa in metri. Valori di BMI fino a  $24,9 \text{ kg/m}^2$  sono considerati normali, valori compresi tra 25 e  $29,9 \text{ kg/m}^2$  individuano soggetti in sovrappeso, valori uguali o superiori a 30 sono diagnostici per obesità [16]. Si tratta comunque di parametri essenziali ma non sufficienti per diagnosticare l'obesità, che necessita di un'analisi più approfondita del grasso corporeo. Oggi i professionisti della nutrizione e del fitness accompagnano alla misura del BMI quella della bioimpedenziometria, una misura più specifica della "natura biologica" del peso, dove con degli elettrodi si misura la "bioresistenza" al passaggio di una corrente elettrica a bassa potenza e alta frequenza [17]. Due individui infatti possono entrambi avere un BMI superiore a  $25 \text{ kg/m}^2$  ma in un caso si può essere di fronte a una sviluppata massa muscolare, in un altro caso a eccessivo grasso addominale.

L'obesità è definita *primaria*, quando è generata dalle cattive abitudini alimentari e scarsa attività fisica, *secondaria* quando è causata da una disfunzione endocrino-metabolica o genetica. In questa tesi ci si occuperà prettamente dell'obesità primaria considerata "l'epidemia non infettiva di più vaste proporzioni del terzo millennio" [18]. A seconda della sede di prevalente localizzazione, l'obesità presenta una distribuzione androide o ginoide. L'obesità androide è prevalente nel sesso maschile ed è caratterizzata da una distribuzione del grasso soprattutto in sede addominale e nella parte alta del corpo. L'obesità ginoide è invece quella in cui il grasso si dispone principalmente nella parte bassa del tronco (glutei e fianchi) con adipe intraddominale relativamente scarso.



*Distribuzione androide o ginoide del grasso nell'obesità*

L'eziologia dell'obesità si basa sulla rottura dell'equilibrio tra apporto calorico e dispendio energetico, con conseguente aumento del peso corporeo e di grasso addominale [1]. Il bilancio energetico del nostro organismo si basa, infatti, sulla trasformazione del cibo ingerito in energia, e sull'utilizzo di questa energia per far fronte alle funzioni fisiologiche basali del nostro organismo e per le funzioni attive (come il lavoro fisico). L'aumento dell'introito di cibo e contemporaneamente la diminuzione del consumo energetico "attivo" portano al sovrappeso e all'obesità. L'accumulo di grasso comporta una serie di disregolazioni metaboliche tra le quali la resistenza insulinica è una delle più conosciute.

### *1.2.2 L'insulino-resistenza*

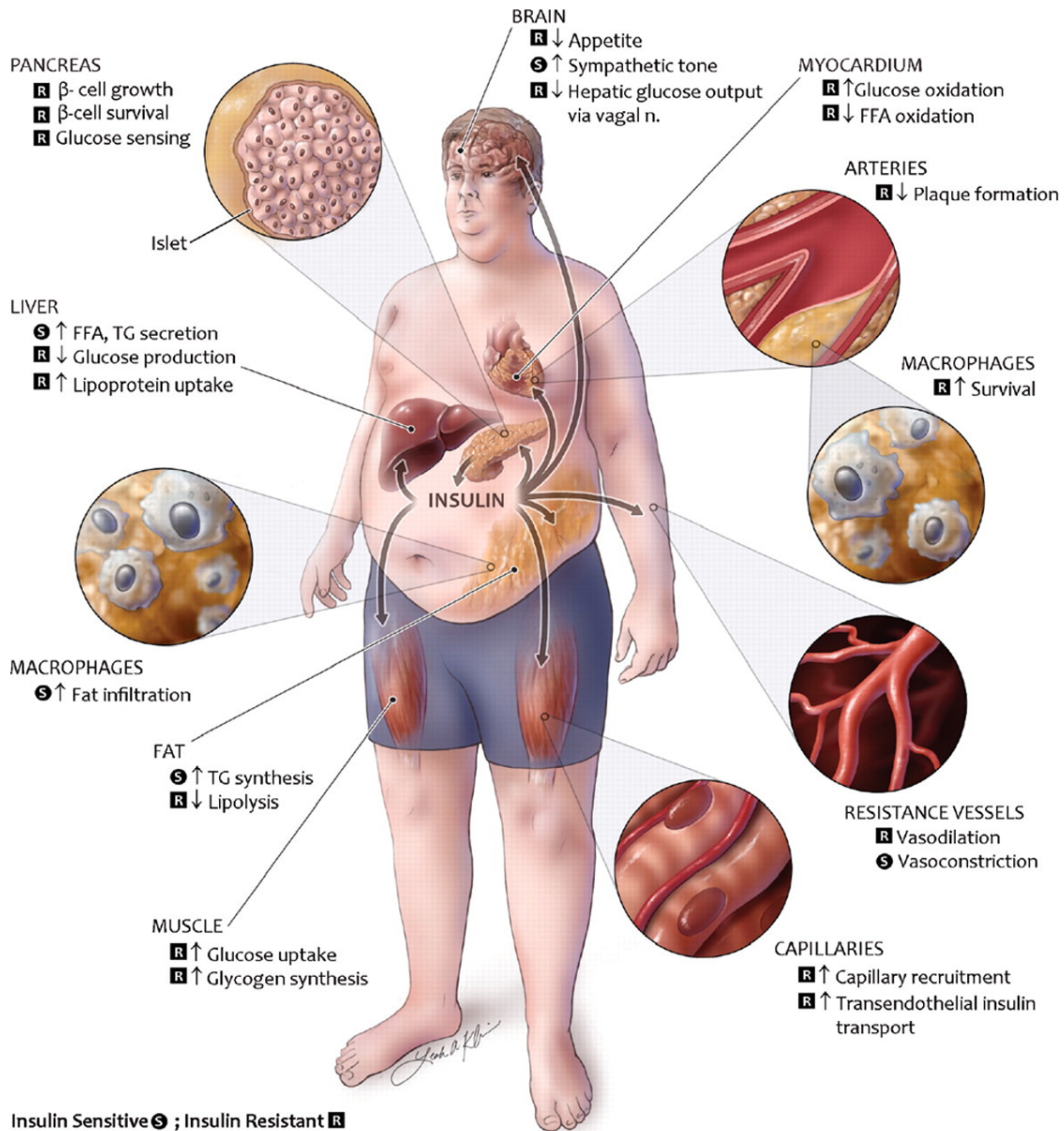
L'insulino-resistenza consiste nell'incapacità dell'insulina (ormone peptidico ipoglicemizzante, che permette di mantenere livelli di glucosio entro il range fisiologico) di produrre i suoi effetti biologici a livello cellulare, nei distretti periferici (muscolo scheletrico, il fegato e il tessuto adiposo) e centrali (l'ipotalamo) del nostro organismo [19]. In queste aree si registra un incremento dell'espressione dei recettori insulinici tale da portare a una diminuzione dell'azione dell'ormone, e un conseguente aumento della produzione insulinica (iperinsulinemia). Il meccanismo che spiega come l'accumulo di grasso e di peso corporeo porti alla resistenza insulinica non ha ancora trovato

un'unica spiegazione, secondo alcuni sono spiegate dalla teoria dello “stato infiammatorio”. L'obesità rappresenterebbe uno stato infiammatorio cronico nel quale molecole infiammatorie prodotte dai macrofagi infiltrati negli adipociti altererebbero la fisiologia delle cellule beta pancreatiche modificando la secrezione insulinica [19]. Secondo un altro approccio, l'insulino-resistenza sarebbe generata da accumuli patologici di grasso nei distretti pancreatici ed epatici nei soggetti gravemente obesi e con un tessuto adiposo incapace di accumulare grasso [19]. Infine, altri studiosi ritengono che in seguito all'espansione dei depositi di grasso, le cellule adipose vadano incontro ad una alterazione della loro capacità' endocrina di secrezione di adipochine e questo indurrebbe un'alterazione metabolica dei tessuti target sui quali queste molecole agiscono.

### *1.2.3 La sindrome metabolica*

Le conoscenze scientifiche e cliniche acquisite negli ultimi anni, hanno evidenziato come l'obesità possa essere considerata uno dei fattori che contribuiscono allo sviluppo di una patologia molto più complessa e grave che viene individuata comunemente con il termine di “sindrome metabolica” derivante da condizioni di metabolismo alterato, come l'incremento dei livelli di colesterolo LDL (lipoproteine a bassa densità) e la diminuzione di quello HDL (lipoproteine ad alta densità) nel sangue, elevati livelli di trigliceridi, ipertensione, iperglicemia e insulino-resistenza [20,21]. Questi fattori di rischio metabolico che caratterizzano la patologia, sembrano promuovere in modo diretto lo sviluppo di diabete di tipo II e malattie cardiovascolari e sembra essere associata anche con l'alterazione delle funzioni riproduttive e lo sviluppo di tumori. Nell'uomo la sindrome metabolica viene diagnosticata quando son presenti elevati livelli di glicemia a digiuno (> di 110 mg/dl) con insulino-resistenza, obesità addominale (circonferenza addominale superiore ai 102 cm per gli uomini e 88 cm per le donne), diminuiti livelli di colesterolo HDL(<40 mg/dl negli uomini, <50 mg/dL nelle donne), alti livelli di trigliceridi (>150 mg/dl) ed elevata pressione arteriosa (> 130/85

mm Hg) e BMI > 25 [21]. In una recente definizione della International Diabetes Federation, l'obesità addominale è il tratto essenziale nella diagnosi di sindrome metabolica, a questo dato si devono aggiungere le nuove scoperte nel campo dell'istologia del tessuto adiposo che si andranno ora ad approfondire.



Signaling dell'insulina tessuto specifica e sindrome metabolica, tratto da: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2012 [19].

#### *1.2.4 Il tessuto adiposo*

Il tessuto adiposo in tutti i mammiferi si distingue in tessuto adiposo bianco (WAT) e tessuto adiposo bruno (BAT). Il WAT accumula trigliceridi e funge da riserva energetica per l'organismo, il BAT possiede la capacità di produrre calore per mantenere stabile la temperatura corporea in seguito a stress termogenici. La produzione di calore in questo tessuto avviene per mezzo del disaccoppiamento della produzione di ATP dalla fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Il disaccoppiamento è operato da specifiche proteine (UCP1) che causano dispersione del gradiente protonico creato durante la respirazione cellulare [22]. In questo modo l'energia è dissipata sotto forma di calore, ed il metabolismo energetico diventa meno efficiente. Elevati livelli di leptina nell'ipotalamo del ratto determinano riduzione nell'espressione dell'mRNA di UCP1 diversamente da quanto osservato nello stato di digiuno [22] che induce l'aumento dell'attivazione del BAT. Utilizzando indagini tomografiche con emissione di positroni (PECT/CT) si è definitivamente dimostrato la presenza di BAT anche in soggetti umani adulti [23]. L'espressione di recettori  $\beta_3$  adrenergici è un'altra caratteristica importante del BAT e l'attività termogenica di questo tessuto è regolata dal sistema nervoso simpatico (SNS) attraverso l'azione della noradrenalina (NA) su questi recettori. Oltre a mediare gli effetti termogenici del BAT, l'azione della NA sui recettori  $\beta_3$  adrenergici può determinare la trasformazione di adipociti bianchi in adipociti bruni. È stato visto infatti che esposizioni prolungate al freddo e trattamenti con farmaci  $\beta$  agonisti possono indurre transdifferenziazione nei roditori [22,23]. Popolazioni cellulari distribuite in modo sparso nel tessuto adiposo bianco e aventi fenotipo intermedio tra cellule adipose bianche e cellule brune, sembrano fungere da riserva di cellule capaci di convertirsi in cellule brune [23]. Queste recenti scoperte insieme ad altre che contribuiscono a chiarire i meccanismi attraverso i quali avviene la formazione e la differenziazione del BAT suggeriscono il ruolo potenziale di tale tessuto e dei geni che lo caratterizzano nell'insorgenza dell'obesità.

Le anomalie del deposito di grasso e la sua mobilizzazione sono un altro potenziale meccanismo responsabile dell'obesità nell'uomo. L'adipocita accumula l'eccesso di grasso come triacilglicerolo; quando i depositi di grasso sono mobilitati gli acidi grassi non esterificati vengono rilasciati nel circolo sanguigno. E' stato ampiamente dimostrato che la massa grassa nell'uomo è determinata sia dalla dimensione che dal numero degli adipociti. Spalding et al. hanno stabilito anche che la popolazione di adipociti si stabilizza completamente durante l'infanzia e l'adolescenza a prescindere dal peso, ma poi rimane regolata saldamente a un numero costante durante l'età adulta. Ne deriva che i cambiamenti nella massa grassa negli adulti sono dovuti a cambiamenti nella dimensione degli adipociti piuttosto che a un aumento nel numero degli adipociti. Gli stessi Autori hanno dimostrato che l'aumento del numero di adipociti in pazienti con obesità a insorgenza precoce persiste anche nell'età adulta. Inoltre, studi su individui che in precedenza erano obesi e che poi hanno perso peso hanno mostrato un'associazione tra l'iperplasia del tessuto adiposo e deficit di leptina, che probabilmente promuove l'accumulo di lipidi negli adipociti attraverso l'aumento della sensazione di appetito ed una riduzione della spesa energetica.

### *1.2.5 La leptina e l'adiponectina*

La capacità endocrina del tessuto adiposo si manifesta con l'espressione dei due principali target metabolici: la leptina e l'adiponectina [23]. La leptina ha un ruolo principe nella regolazione del bilancio energetico attraverso due meccanismi: assunzione di cibo e spesa energetica. Viene secreta dal tessuto adiposo in sinergia con l'aumento dell'insulina nel sangue e "comunica" a livello ipotalamico riducendo l'appetito e inducendo sazietà. Nei roditori la leptina agisce aumentando la spesa energetica attraverso la termogenesi del BAT [23]. Inoltre esiste una correlazione lineare positiva tra i livelli circolanti di leptina e la massa grassa totale [24]. Infatti l'espressione della leptina è direttamente proporzionale ai livelli di tessuto adiposo presente. Ma nonostante negli obesi

le dimensioni degli adipociti siano aumentate 2-4 volte e la secrezione di leptina risulti fino a 7 volte più alta rispetto a quelle di un soggetto normopeso questi alti livelli di leptina sierica non inducono senso di sazietà [25,26]. Tale situazione è nota come leptino-resistenza i cui mediatori molecolari responsabili della sua insorgenza sembrano essere alcune proteine, SOCS3 e PTP1B, coinvolte nella trasmissione intracellulare del segnale innescata dal legame della leptina con il suo recettore. I soggetti obesi affetti da leptino-resistenza non “sentono” più i segnali di sazietà dettati dalla leptina e continuano a mangiare incrementando il tessuto adiposo. Insieme alla leptina un altro importante “signaling” metabolico espresso dal tessuto adiposo è l’adiponectina. L’adiponectina è espressa abbondantemente nell’adipocita, ma, diversamente da altre adipochine, i suoi livelli plasmatici sono ridotti nell’adiposità addominale. I livelli plasmatici di adiponectina, oltre che nell’obesità addominale, sono ridotti nel sesso maschile e nella donna in post menopausa, nell’ipertensione arteriosa, nell’ipertrigliceridemia, nel diabete di tipo 2 e nella cardiopatia ischemica. L’adiponectina migliora la sensibilità all’insulina nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato; favorisce l’ossidazione dei lipidi; migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente; riduce l’espressione delle proteine di adesione; contrasta gli effetti negativi delle lipoproteine a bassa densità ossidate sulla funzione endoteliale; inibisce la differenziazione dei monociti e la formazione di cellule schiumose; ha anche azione antitrombotica riducendo l’aggregazione piastrinica e la formazione di trombi [26,27]. Per quanto gran parte di questi effetti sia frutto di studi *in vitro* o nell’animale, l’adiponectina mostra di possedere importanti proprietà antiaterogene, antidiabetiche e antinfiammatorie anche nell’uomo. I soggetti con elevati livelli plasmatici di adiponectina hanno un rischio significativamente ridotto di eventi cardiovascolari maggiori, anche dopo aggiustamento per colesterolo legato a lipoproteine a bassa e ad alta densità, peso corporeo, diabete, e ipertensione arteriosa [27]. Secondo alcuni autori, l’ipoadiponectinemia che caratterizza i soggetti con obesità

addominale e sindrome metabolica sarebbe l'elemento chiave per giustificare il rischio cardiometabolico di questa condizione patologica [27].

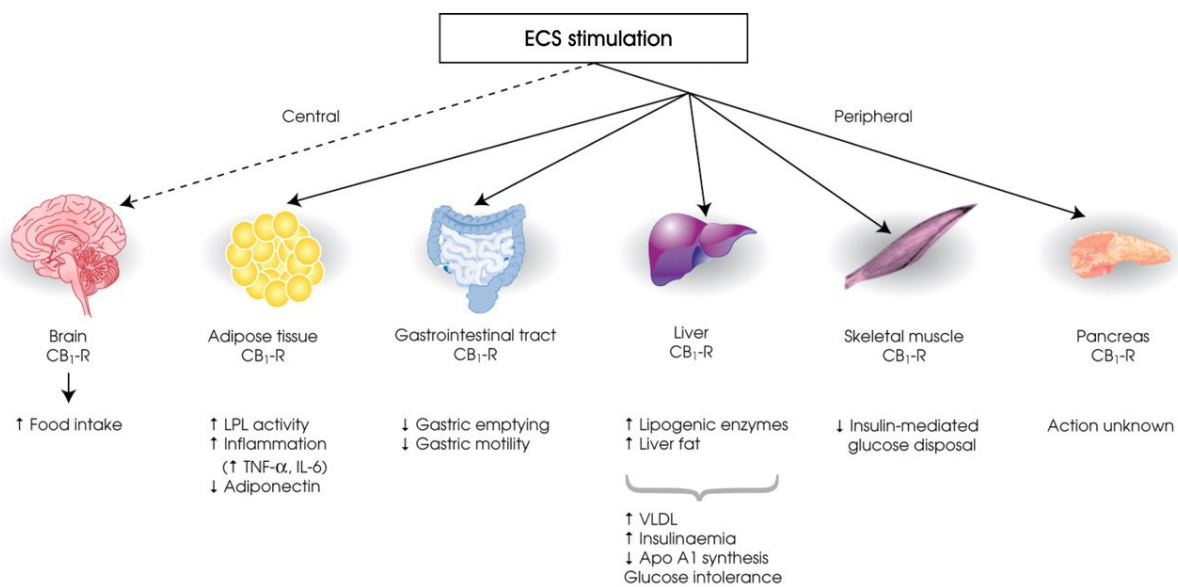
## **1.3 Obesità e sistema endocannabinoide**

### *1.3.1 Il sistema endocannabinoide*

Gli endocannabinoidi (EC) sono molecole lipidiche prodotte a partire dal metabolismo degli acidi grassi che agiscono come ligandi endogeni principalmente a livello di due recettori: il recettore dei cannabinoidi di tipo 1 (CB1) o il recettore dei cannabinoidi di tipo 2 (CB2)[28,29]. I recettori CB1 sono distribuiti in modo più significativo in alcune zone cerebrali come ad esempio i gangli della base, il cervelletto, l'ippocampo e la corteccia. Una minore concentrazione è invece localizzata in altre aree per esempio nel tronco cerebrale dove sono localizzati i centri regolatori della respirazione e della funzione cardiaca. Inoltre sono stati localizzati anche in aree periferiche come intestino, fegato e tessuto adiposo [30]. I recettori CB1 appartengono ai recettori accoppiati a una proteina G, costituiti da sette segmenti transmembrana e con le porzioni C-terminale e N-terminale intracellulari. Svolgono un ruolo chiave nella trasduzione del segnale, in particolare l'interazione tra recettore associato a proteina G inibitore e il ligando cannabinoide, causa inibizione dell'adenilato ciclasi, dei canali al calcio N e P/Q, attiva quelli al potassio e stimola le MAP chinasi. Anche i recettori CB2 sono recettori associati a proteina G e sono principalmente distribuiti a livello della milza, tonsille e nelle cellule immunitarie, recentemente, sono stati identificati nel sistema nervoso centrale (cellule gliali e neuronali) [31]. Anche il recettore CB2 è in grado di inibire l'adenilato ciclasi attivando la MAP chinasi come recettore CB1[29]. Su questi recettori agiscono i cannabinoidi endogeni, tra questi i più studiati sono N-arachidonoiletanolamina (AEA), o anandamide, e 2-arachidonoil glicerolo (2-AG). Complessi meccanismi enzimatici regolano la sintesi e la degradazione di queste molecole endogene. In particolare, la degradazione degli EC



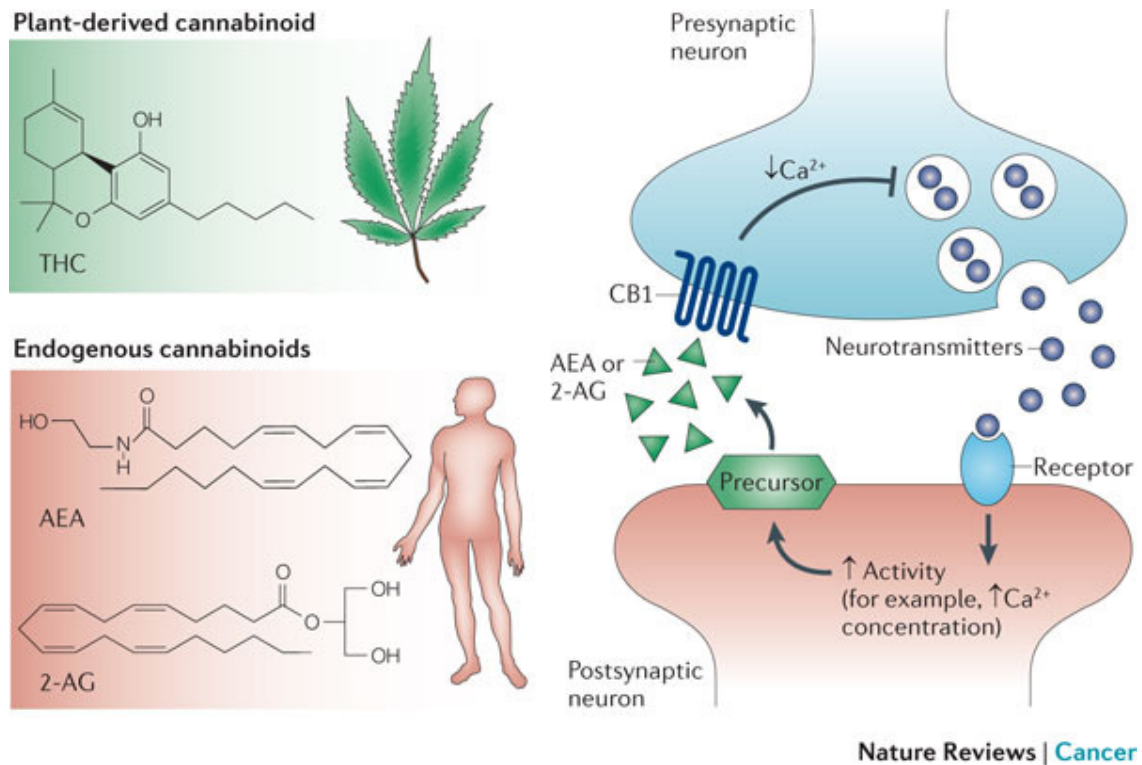
prevede l'idrolisi dell'AEA ad acido arachidonico ed etanolamina da parte dell'enzima amide idrossilasi degli acidi grassi (FAAH) [29]. Dato che FAAH è il principale enzima responsabile della degradazione di AEA, l'inibizione farmacologica di FAAH rappresenta un potente strumento di induzione e prolungamento dell'azione dell'AEA endogeno. Inoltre diversi lavori hanno messo in evidenza come la modulazione dell'espressione di FAAH nel grasso viscerale sia coinvolta nello sviluppo dell'obesità e sindrome metabolica [28,29]. Nel complesso, gli enzimi coinvolti nella regolazione della biodisponibilità degli endocannabinoidi insieme agli stessi EC ed ai loro recettori, costituiscono quello che viene definito il sistema endocannabinoide (ECS) [29].



*Distribuzione del sistema endocannabinoide*

Gli EC svolgono una lunga serie di effetti biologici molti dei quali coinvolgono i neuroni e sono dovuti alla proprietà di queste molecole di fungere da neurotrasmettitori. Differentemente dai canonici neurotrasmettitori gli EC non vengono immagazzinati a livello di vescicole dopo la loro sintesi, ma piuttosto prodotti a richiesta, *on demand*, a partire da lipidi della membrana postsinaptica. Dopo essere stati prodotti, gli EC possono diffondere nella membrana presinaptica ed

agire regolando sia in modo eccitatorio che in modo inibitorio la trasmissione del segnale nervoso nel SNC e nel sistema nervoso periferico (SNP). E' ormai noto come l'obesità si possa associare ad una iper-regolazione del sistema endocannabinoide in quanto comporta un aumento dei livelli circolanti/tissutali di EC e del recettore CB1, che rappresenta il recettore degli endocannabinoidi maggiormente coinvolto nella relazione patofisiologica esistente tra ECS ed obesità [29]. Le evidenze sperimentali circa una *up-regolazione* del ECS nell'obesità sono molteplici e aumentati livelli di EC sono stati riscontrati nell'ipotalamo di topi obesi [29].

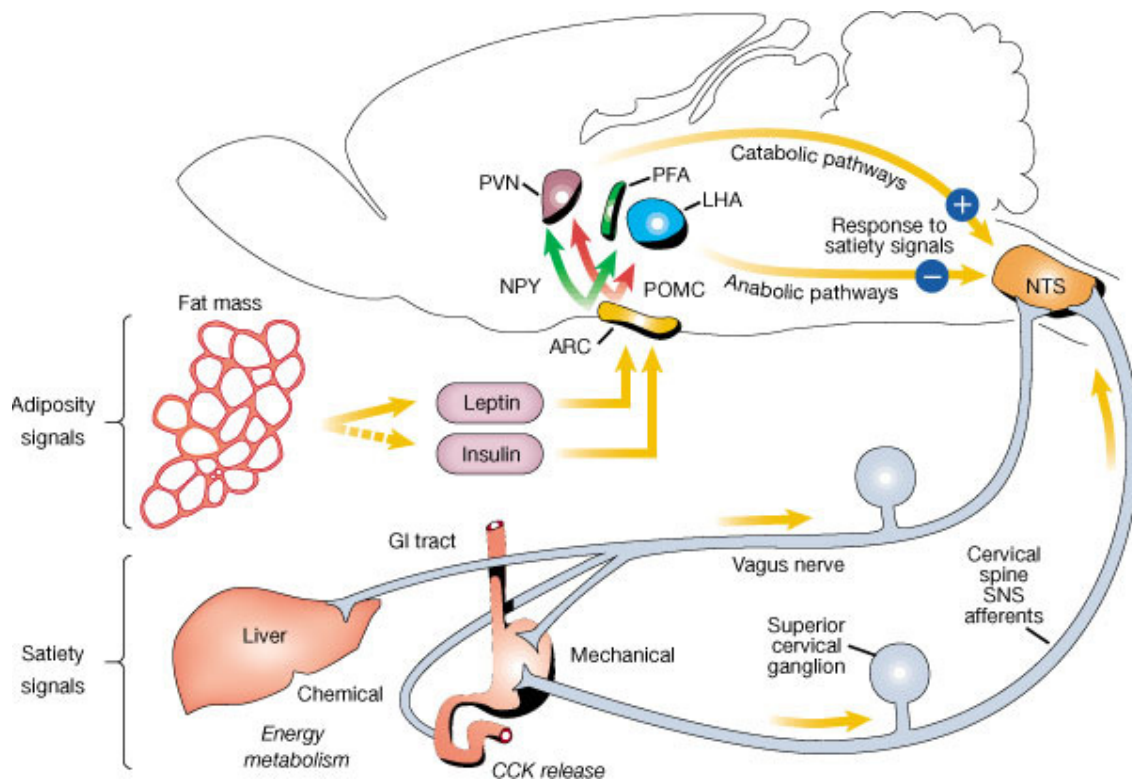


*Attivazione del Sistema endocannabinoide*

### *1.3.2 Signaling ipotalamici di fame e sazietà*

In particolare, il 'signalling' degli EC nel cervello è alla base della stimolazione dei pathways neuronali di "fame e sazietà nell'ipotalamo [32]. Nell'ipotalamo vi sono due centri distinti che regolano la fame e la sazietà, il "Feeding Center" e il "Saziety Center". Il "Feeding center" è 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 [33]. Questi centri ipotalamici devono essere intesi come "reti nervose" che interagiscono con le altre strutture del SNC (corteccia cerebrale, sistema limbico, sistema nervoso autonomo), con i distretti periferici (tessuto adiposo, fegato, muscoli), e non ultimo con l'ambiente. Il nucleo arcuato dell'ipotalamo rappresenta il centro di elaborazione primaria dell'informazione metabolico-energetica. Il nucleo arcuato è costituito da due diversi set di neuroni: AgRP/NPY e POMC/CART [33]. 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. Questi ormoni, come visto in precedenza segnali di sazietà, sono prodotti rispettivamente dal tessuto adiposo e dal pancreas in quantità proporzionali alle riserve energetiche si legano ai recettori presenti sui due set di neuroni, inibendo AgRP/NPY e stimolando POMC/CART [34]. 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  $\alpha$ -

MSH (melanocyte stimulating hormone), che deriva dal precursore POMC in seguito al suo clivaggio post-traduzionale [33]. 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -MSH con funzione inibitoria e il neuropeptide AgRP, antagonista che si lega al recettore occupando il sito di legame per  $\alpha$ -MSH, impedendo così l'inibizione di questi neuroni. Per quanto riguarda invece il centro che controlla l'appetito, nell'ipotalamo laterale, è costituito da due gruppi di neuroni: quelli che sintetizzano orexina e quelli che sintetizzano MCH (melanin concentratine hormone), ormoni ad azione oressigenica [34].



*Pathway ipotalamici di fame e sazietà*

Entrambi i neuroni sono espressi in modo uniforme all'interno di LHA e costituiscono 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 [33,34].

### *1.3.3 Signaling periferici: intestino*

Il recettore CB1 e altre componenti del ECS, come detto in precedenza, sono funzionalmente attivi non solo nei vari distretti neuronali del SNC e del SNP ma anche a livello non neuronale in svariati tessuti periferici come il fegato, il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico, il pancreas e l'apparato gastrointestinale capaci di modulare, in concerto con SNC, il senso di fame e sazietà [35]. Esistono infatti due ormoni la colicistochenina (CCK) e il glucagone like peptide 1 (GLP-1), entrambi prodotti dall'intestino a livello duodenale, che stimolando il nervo vago a livello locale segnalano ai nuclei LHA e PVN ipotalamici una diminuzione dell'assunzione di cibo. Inoltre, recenti evidenze hanno dimostrato la capacità dei circuiti nervosi presenti nell'apparato gastrointestinale di trasmettere segnali di sazietà e di fame alle strutture nervose superiori anche attraverso il ECS. Infatti, è stato dimostrato che l'attivazione del recettore CB1 intestinale da parte degli EC può modificare l'azione di neuroni vagali localizzati nell'intestino che a loro volta agiscono sul SNC producendo modificazioni del comportamento alimentare [35]. L'importanza del ruolo del sistema gastrointestinale nel mediare la risposta iperfagica indotta dagli EC è stata inoltre confermata da un

altro studio in cui si è visto come la proprietà oressigenica degli EC scompaia in modelli animali privati della funzionalità di alcune popolazioni neuronali dell'intestino [36].

#### *1.3.4 Signaling periferici: tessuto adiposo*

Numerose evidenze sperimentali accumulate negli ultimi anni hanno dimostrato come oltre alla funzione classica di regolazione del comportamento alimentare, gli EC e il recettore CB1 possano influenzare l'attività di organi periferici producendo modificazioni nella spesa energetica e nella termogenesi a livello dell'intero organismo [35]. La capacità di influenzare il metabolismo energetico periferico dipende probabilmente da una azione pleiotropica del ECS a diversi livelli anatomici. Il tessuto adiposo bianco è il distretto anatomico periferico più studiato in questo senso e gli EC svolgono diversi effetti in corrispondenza dell'adipocita come la promozione dell'adipogenesi e la stimolazione della sintesi di trigliceridi e dell'uptake di glucosio [36]. Infatti, diversi lavori hanno evidenziato come in soggetti gravemente obesi si registra un aumento degli enzimi deputati alla sintesi degli acidi grassi come la sintasi degli acidi grassi (FAS) nel tessuto adiposo. Jourdan et al ha dimostrato come topi che non esprimevano l'enzima FAS, per una mutazione genetica, nonostante avessero una dieta ipercalorica non divenivano "obesi"[37]. In questi topi geneticamente modificati, si osservato un passaggio dal tessuto adiposo bianco verso un tessuto simile al BAT, con un'aumentata attività mitocondriale, e un blocco dell'inclusione di grasso. Ne consegue che l'inibizione dell'attivazione del ECS a livello del tessuto adiposo, in soggetti obesi, porti a un' inattivazione o una diminuita attività enzimatica del FAS nel tessuto adiposo, e un'aumentata attività metabolica mitocondriale, con una conseguente perdita di peso. Inoltre il farmaco CB1 antagonista rimonabant aumenta l'attività termogenetica del BAT nel ratto [38-40]. In questo senso il blocco farmacologico del recettore CB1 potrebbe avere degli effetti

antiobesità ripristinando la funzionalità termogenetica del tessuto patologicamente *down-regolata* dagli endocannabinoidi.

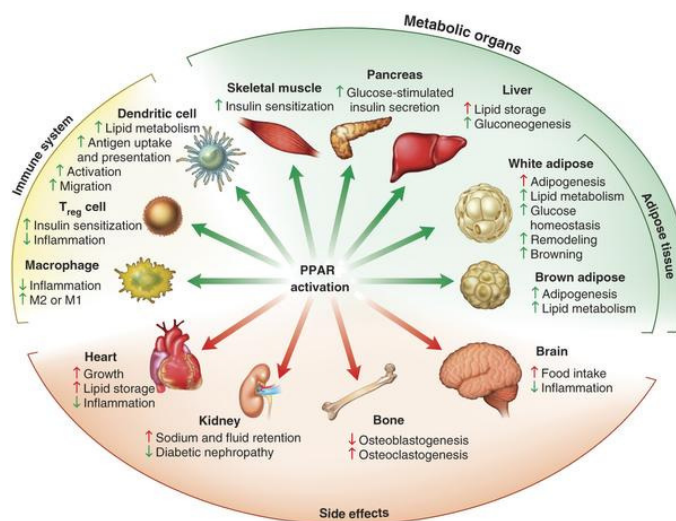
### 1.3.5 Signaling periferici: fegato

L'ECS epatico sembra avere invece un ruolo determinante nel regolare il profilo metabolico dell'individuo obeso, infatti in modelli animali un'iperattivazione del ECS sopprime l'attività dell'enzima carnitina-palmitoiltrasferasi (CPT-1) [41], un importante enzima ad azione stimolatoria su ossidazione lipidica e spesa energetica. Inoltre altri modelli animali che presentano delezione tessuto specifica del recettore CB1 nel fegato esprimono un fenotipo caratterizzato da una ridotta produzione di lipidi da parte del fegato e risultano protetti dalla steatosi epatica e dall'aumento di trigliceridi plasmatici e di colesterolo che si origina in seguito a somministrazione di una dieta ipercalorica [37]. In altri modelli murini di obesità si sono riscontrate alterazioni nel metabolismo energetico in particolare nelle vie glicolitiche regolate dall'enzima glucochinasi (GK) e piruvato chinasi (PK) [37,41]. L'espressione della GK è insulino-dipendente e aumenta con l'aumentare dell'insulina e del glucosio, quest'enzima ha il compito di fosforilare il glucosio verso la via anabolica della sintesi del glicogeno. La PK invece è un enzima fondamentale di "controllo" del ciclo di Krebs, ha il compito di trasformare il fosfoenolpiruvato in piruvato e ATP. Si è osservato che in topi obesi, sottoposti ad una dieta fortemente ipercalorica insieme ad una iper-attivazione del ECS si ha una *down-regulation* di questi due enzimi generata da un'insulino-resistenza epatica e un blocco o rallentamento del metabolismo energetico [ref]. Queste funzioni metaboliche sembrano "riattivarsi" grazie al blocco periferico del recettore CB1 con farmaci antagonisti, i quali stimolano la lipolisi nel tessuto adiposo, contribuendo alla riattivazione dei meccanismi della spesa energetica a livello epatico [37]. Inoltre, questa *stimolazione* metabolica, indurrebbe un aumento dei livelli

plasmatici degli acidi grassi liberi (FFA) disponibili ad essere ossidati dallo stesso tessuto adiposo e dal muscolo, generando un ulteriore aumento generalizzato della spesa energetica [37].

### 1.3.6 Le PPARs

I meccanismi di azione che regolano la lipolisi nel tessuto adiposo sono ancora in fase di definizione, nonostante ciò, è stato dimostrato un controllo del bilancio energetico attraverso l'influenza sull'attività mitocondriale del recettore CB1 espresso negli adipociti [42,43]. Questa attività è connessa con una classe di recettori nucleari attivati dai proliferatori perossisomiali (PPARs) [42]. I PPARs sono fattori di trascrizione attivati da ligandi, che appartengono alla superfamiglia di recettori nucleari, che include anche i recettori degli steroidi e dell'ormone tiroideo. In quanto fattori di trascrizione, i PPARs regolano l'espressione di numerosi geni e intervengono sul controllo della glicemia, del metabolismo lipidico, sul tono vascolare e sull'infiammazione.



*Le PPARs*

Le principali isoforme alfa e gamma sono espresse rispettivamente nel fegato e nel tessuto adiposo. L'attivazione dell'isoforma PPAR-gamma migliora la sensibilità per l'insulina, riduce



l'infiammazione, il livello plasmatico degli acidi grassi liberi e conseguentemente inibisce l'aterogenesi, migliora la funzione endoteliale e riduce gli eventi cardiovascolari. E' stato osservato come l'azione di composti antagonisti del recettore CB1 abbiano un effetto sull'espressione del PPAR-gamma generando un benefico effetto sul metabolismo. La PPAR-alfa, invece, è un fattore di trascrizione e un importante regolatore del metabolismo lipidico nel fegato, viene attivata in condizioni di privazione di energia ed è necessaria per il processo di chetogenesi, una chiave di risposta adattativa al digiuno prolungato [43]. L'attivazione della PPAR-alfa promuove l'assorbimento, l'utilizzo e il catabolismo degli acidi grassi *up-regolando* i geni coinvolti nel trasporto di questi stessi.

#### **1.4 L'obesità: Terapia**

Una delle strategie adottate per contrastare l'obesità, patologia debilitante e altamente onerosa per il Servizio Sanitario Nazionale, risulta essere quella della diminuzione dell'apporto calorico associata a una adeguata attività fisica. Purtroppo questa strategia non ripristina sempre i parametri fisiologici nei soggetti obesi e il regime dietetico, spesso, priva il soggetto obeso di pietanze che lo "gratificano" rendendo difficile portare a termine la dieta. A ciò si aggiunge che non sempre l'attività fisica è priva di effetti collaterali nei soggetti con BMI superiore a 30 kg/m<sup>2</sup>. Sulla base di questi presupposti la ricerca farmacologica ha sviluppato in questi ultimi 20 anni dei composti capaci di regolare l'apporto calorico e alcuni parametri biochimici associati alla sindrome metabolica. Tra questi ricordiamo gli anfetamino-simili (Fentermina, Sibutramina) utilizzati negli USA, ma con effetti collaterali cardiovascolari, e comunque da associare a una regolare attività fisica [44]. Gli inibitori delle lipasi pancreatiche (Orlistat) capaci di bloccare l'assorbimento dei lipidi a livello intestinale, portando, però, a un malassorbimento delle vitamine liposolubili [44]. E infine i cannabinoidi antagonisti/agonisti inversi, che agiscono sui centri ipotalamici che regolano il

senso di sazietà, e a livello periferico migliorando l'assetto lipidico contrastando gli effetti della sindrome metabolica [45]. Diversi trials clinici hanno testato in esseri umani in sovrappeso o obesi l'azione del farmaco CB1 antagonista rimonabant (il primo in questa classe di farmaci ad essere stato sintetizzato) e tutti gli studi effettuati dimostrano che il farmaco induce una significativa perdita di peso e un miglioramento delle alterazioni metaboliche nei pazienti testati [46-49]. Sebbene il rimonabant sia stato introdotto nel commercio nel 2005, un'attenta analisi dei suoi effetti su una larga scala di pazienti ha evidenziato una serie di eventi avversi di natura psichiatrica legati all'utilizzo di questo farmaco come ansia, depressione e tendenze suicidarie [50,51]. A causa di questi effetti negativi il rimonabant è stato ritirato dal commercio (2007) in quanto considerato farmaco non sicuro e tutti i trials clinici mirati a testare l'efficacia di altri farmaci CB1 antagonisti sintetizzati sono stati interrotti. Nonostante ciò, recenti evidenze sperimentali di questi ultimi anni hanno messo in luce come la componente periferica del ECS possa avere un ruolo importante nel regolare il metabolismo energetico e lo stimolo della fame[52,53]. Alla luce di queste evidenze una nuova strategia farmacologica anti obesità sarebbe rappresentata da farmaci che agiscono esclusivamente bloccando il recettore CB1 periferico preservando gli effetti positivi sul metabolismo senza tuttavia modificare i circuiti del SNC responsabili delle reazioni avverse di natura psichiatrica. Diversi composti CB1 antagonisti selettivi per i tessuti periferici sono stati recentemente testati in animali e sembrano essere particolarmente promettenti nel regolare il peso corporeo e le alterazioni metaboliche generate dall'obesità indotta da dieta [54,55]]. A questi composti vanno aggiunti i cosiddetti antagonisti neutri del recettore CB1, come il NESS0327, il quale migliora l'omeostasi energetica in modelli murini obesi senza mostrare quegli effetti ansiogenici e depressivi del rimonabant [56].

## 2. OBIETTIVO DELLA TESI

Gli studi preclinici che hanno valutato l'efficacia di nuovi farmaci antagonisti per il recettore CB1 periferico hanno identificato una serie di effetti positivi sia sul controllo dell'appetito che sull'efficienza metabolica, e sulle disregolazioni metaboliche spesso associate all'obesità. Inoltre alcuni di questi nuovi potenziali farmaci presentano un profilo da CB1 antagonista "neutro". Anche questi composti mostrano un miglioramento del profilo lipidico e del metabolismo del glucosio accompagnato da una riduzione della massa grassa e del peso corporeo.

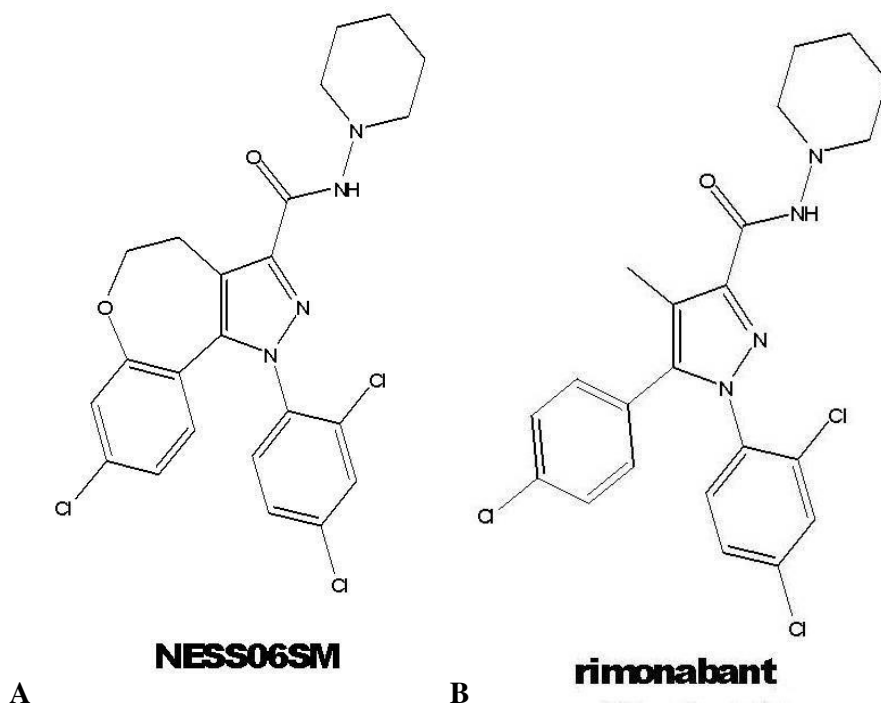
Sulla base delle premesse discusse fino a questo momento, l'obiettivo di questa tesi è stato quello di caratterizzare nuovi composti antagonisti neutri CB1 con attività anti-obesità. Dopo un attento studio struttura-attività (SAR), sono stati sintetizzati nei laboratori PharmaNess scarl nuovi composti pirazolici tricyclici condensati aventi affinità e selettività verso i recettori CB1. Tra i nuovi composti è stato scelto il NESS06SM, sia per la sua affinità per il recettore CB1, che, sulla base di modelli informatici, per la sua scarsa permeabilità verso la barriera ematoencefalica. Soprattutto quest'ultima caratteristica è stata essenziale per evitare gli effetti negativi sul sistema nervoso centrale osservati sul rimonabant. In questa tesi è stata valutata la capacità del NESS06SM di ridurre il peso corporeo e migliorare i fattori di rischio cardiovascolare su modelli animali più rappresentativi dell'obesità umana, i topi DIO (Diet induces obesity). Su questi modelli sono stati monitorati i livelli plasmatici di glucosio, trigliceridi, colesterolo e transaminasi. Inoltre è stata valutata a livello periferico l'azione del NESS06SM sulla regolazione dell'espressione genica dei messaggeri peptidici leptina e adiponectina, sui circuiti enzimatici epatici e adiposi regolanti il metabolismo. Nonostante il NESS06SM abbia mostrato una scarsa permeabilità ematoencefalica sono stati monitorati gli effetti sulla regolazione dell'espressione genica dei peptidi ipotalamici che regolano il senso di fame e sazietà. Inoltre, per meglio evidenziare l'assenza di quegli effetti

negativi centrali del rimonabant è stata valutata l'azione del NESS06SM sulla regolazione dell'espressione dei trasportatori monoaminergici e delle neurotrofine.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 NESS06SM

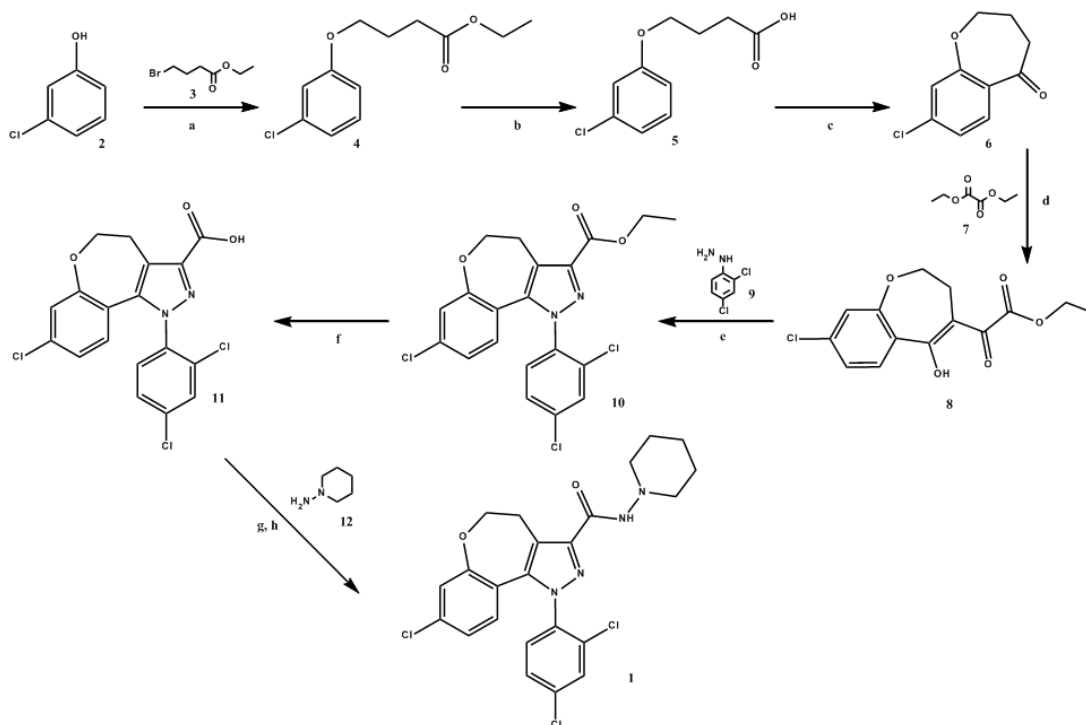
NESS06SM (Figura 1) (8-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)-N-piperidin-1-yl-4,5-dihydrobenzo-1H-6-oxa-cyclohepta(1,2-c)pyrazole-3-carboxamide) è stato sintetizzato nei laboratori PharmaNess scarl, secondo la procedura generale descritta nel brevetto US Application US2010/0215741 [57] e di seguito brevemente riportata (Figura 2).



**Figura 1.** Struttura del composto NESS06SM (A), rimonabant (B).

L' 8-cloro-1-osso-2,3,4,5-tetraidrobencicloeptan-5-one **6** è stato ottenuto a partire dal 3-clorofenolo (**2**) per addizione di 4-bromobutirrato di etile (**3**)[58], seguita da idrolisi basica per ottenere l'acido 4-(3-chlorophenossi)butirrico (**5**) e da ciclizzazione con acido polifosforico. L' $\alpha,\gamma$ -dichetoestere **8** è stato ottenuto mediante condensazione di Claisen, aggiungendo il chetone **6** ad una miscela di dietil ossalato (**7**) e sodio etossido in etanolo a temperatura ambiente (Schema 1)[59,60]. La costruzione dell'anello pirazolico del composto **10** è stata ottenuta mediante reazione tra il dichetoestere **8** e la 2,4-diclorofenilidrazina (**9**) in etanolo assoluto a riflusso.[60]

La N-(1-piperidinil)-8-cloro-1-(2',4'-diclorofenil)-4,5-diidrobenczo-1H-6-ossa-cicloep[1,2-c]pirazol-3-carbossammide **1** è stata preparata a partire dall'estere **10** attraverso l'attivazione ad acido carbossilico (**11**) mediante idrolisi basica con idrossido di potassio in metanolo a riflusso, seguita da addizione di 1-amminopiperidina (**12**) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente[59-61], come illustrato nella Figura 2 e di seguito riportata in dettaglio.



**Figura 2.** Reagenti e condizioni di reazione (a)  $K_3CO_3$ , NaI, acetone,  $N_2$ ,  $\Delta_{ref}$  24h; (b) KOHaq 10%,  $\Delta_{ref}$  24h; (c) PPA, 90 °C 1,5h; (d) 2 eq. di Na, EtOH assoluto, 1,5h t.a.; (e) EtOH,  $\Delta_{ref}$  14h ; (f) KOH, MeOH,  $\Delta_{ref}$  12h; (g) EDC·HCl, HOBT·nH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/2h t.a.; quindi (h) **13a-b**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20h t.a.

Tutti i punti di fusione sono stati ottenuti su un Apparato per Punto di Fusione Stuart SMP10 e sono riportati senza correzione. Gli spettri FT-IT sono stati registrati su uno Spettrofotometro Bruker Alpha-T FT-IR dotato di Alpha Eco ATR come modulo di campionamento e sono espressi in  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>). Tutti gli spettri NMR sono stati registrati su un Bruker Ultra Shield 400 Avance III NMR Spectrometer, con <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C osservati rispettivamente a 400 e a 100 MHz. I chemical shifts per gli spettri <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono espressi in  $\delta$  impostando 0 per il segnale del TMS ((CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si). Le molteplicità sono riportate come s (singoletto), bs (singoletto allargato), d (doppietto), t (tripletto), q (quartetto), qu (quintupletto), dd (doppietto di doppietti), m (multipletto).

Tutte le reazioni che coinvolgevano composti sensibili all'aria o all'umidità sono state condotte in atmosfera di azoto altamente puro. Tutti i reagenti e solventi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich Chemical Company e usati tal quali.

### 3.2 Rimonabant

N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazolo-3-carbossamide (rimonabant, SR141716A, Figura 1B) è stato acquistato da KEMPROTECH, Middlesbrough, Regno Unito.

### 3.3 Attività intrinseca: (<sup>35</sup>S)GTPγS

L'attività intrinseca del NESS06SM è stata saggiata col test (<sup>35</sup>S)GTPγS, è stato infatti dimostrato che gli agonisti CB1 e agonisti inversi mostrano effetti differenti sul (<sup>35</sup>S)GTPγS [62,63]. L'attivazione di un recettore accoppiato alla proteina G da un agonista porta alla sostituzione di guanosina difosfato (GDP) con guanosina trifosfato (GTP). La capacità del GTP di legarsi al recettore è proporzionale al livello di attivazione del recettore stesso. Questa capacità è misurata utilizzando un GTP radiomarcato da [<sup>35</sup>S] chiamato GTPγS. Così la radioattività può essere misurata ed è proporzionale alla quantità di GTP legata al recettore. Il saggio [<sup>35</sup>S] GTPγS viene eseguito con le cellule che contengono solo recettori CB1 o cellule che contengono solo recettori CB2 (cellule ovariche di criceto cinese o cellule renali di embrioni umani, rispettivamente). Inoltre questo saggio può essere realizzato utilizzando tessuti che contengono recettori CB1 (es, cervello) o CB2 (es, milza). Secondo una procedura precedentemente riportato [64], i saggi (<sup>35</sup>S)GTPγS sono stati effettuati utilizzando cellule ovariche di criceto cinese (CHO) transfettate con il recettore CB1 ricombinante umano (cellule CHO CB1). Le Cellule CHO sono state acquistate dalla PerkinElmer (Milano, Italia). L'attività intrinseca è stata preliminarmente valutata utilizzando diverse

concentrazioni di NESS06SM, e con il rimonabant come composto di riferimento. In breve, le cellule CHO vengono rimosse e sono risospese in un tampone (0.32 M Tris/saccarosio 50 mM, Sigma-Aldrich), e omogeneizzati. L'omogenato è stato opportunamente diluito con tampone Tris (50 mM, pH 7.4) e centrifugato a 50.000 g per 45 minuti. Le membrane cellulari (20 mcg) sono state incubate in un tampone contenente 2 mg/mL di acido grasso, albumina bovina priva di siero (BSA), 20 micron PIL e 0.1 nM [<sup>35</sup>S] GTPγS (New England nucleari). Il tampone del saggio contiene: Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.2 mM a pH 7.4. I tempi di incubazione sono stati di 90 minuti a 30° C. La reazione viene terminata tramite l'aggiunta di 4 ml di tampone di lavaggio ghiacciato (Tris 50 mM, 1 mg /mL BSA, pH 7.4) seguita da filtrazione rapida sotto vuoto attraverso Whatman GF/B filtri di fibra di vetro utilizzando un tubo raccogliatore di cellule Brandel. I filtri sono stati lavati 3 volte con 4 mL di tampone di lavaggio e poi essiccati, collocati nel liquido di scintillazione, e la radioattività è stata determinata mediante conteggio a scintillazione liquida, in unità di disintegrazioni per minuto (dpm) con uno spettrometro a scintillazione liquida (TopCount NXT PerkinElmer).

### **3.4 Attivazione recettoriale: Western Blot**

La capacità del NESS06SM di attivare il recettore CB1 è stata valutata anche 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 cellulare N1E-115 (European Collection of Cell Cultures) è stata propagata sino al raggiungimento della confluenza a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 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, 55cm<sup>2</sup>, volume finale 10 ml) per il trattamento farmacologico. I composti di riferimento



ACEA (agonista selettivo CB1, Tocris Bioscience UK) e RIMONABANT (antagonista selettivo CB1) ed il composto in esame NESS06SM, 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 NESS06SM (1 nM, 5 nM, 10 nM, 75 nM e 125 nM). In seguito al trattamento farmacologico l'azione delle molecole è stata interrotta lisando le cellule e procedendo all'estrazione proteica. La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata usando il Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen™) ed il sistema QubitR Quantitation Platform (Invitrogen™). 40 µg di proteine per pozzetto sono state separate su Bis-Tris Gel (NuPAGER NovexR 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 Isotopenmessgerate) e la densità ottica è stata misurata usando il software AIDA 2.11 (Raytest Isotopenmessgerate).

### **3.5 Tossicità in vitro**

Per la valutazione dell'eventuale tossicità del NESS06SM, 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 di NESS06SM, da  $10^{-4}$ M a  $10^{-14}$ M. A tal fine, le cellule sono state propagate in fiasche per colture cellulari da 75 cm<sup>2</sup> (37°C,

5% CO<sub>2</sub>) in appropriato terreno di coltura e additivi (RPMI, 10% Siero Fetale Bovino, 2mM L-Glutamina, Penicillina/Streptomicina, Fungizone, Gentamicina A, Sigma-Aldrich). Raggiunta la confluenza, le cellule sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti per i trattamenti farmacologici con NESS06SM, rimonabant e SDS. 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).

## **2.6 Attività *ex-vivo***

Al fine di implementare il profilo farmacologico dell'antagonista neutro NESS06SM, è stata valutata l'attività antagonista in un modello *ex vivo*, condotta utilizzando come substrato il vaso deferente di topo. Il sistema valuta l'azione dei potenziali antagonisti (NESS06SM e rimonabant) somministrati prima dell'agonista CB1 WIN 55,212-2, nella modulazione della contrazione del vaso deferente. La metodica utilizzata ha previsto il prelievo dei vasi deferenti da topi CD1 (25-40g), il montaggio dell'organo in un bagnetto per organi isolati, contenente una soluzione Krebs-Henseleit mantenuta a 37°C sotto flusso di una miscela O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95:5. Il vaso deferente è stato sottoposto a stimolazioni elettriche capaci di indurre delle contrazioni dell'organo espresse come variazioni pressorie, monitorate con un pc collegato al sistema. Dopo un condizionamento di qualche ora, e dopo essersi accertati delle riproducibilità della risposta contrattile si è aggiunto il principio attivo da testare, il NESS06SM o il rimonabant, e dopo 20 minuti si è aggiunto il composto di riferimento CB1 agonista WIN 55,212-2. L'attività antagonista è stata rilevata

attraverso l'osservazione di una riduzione dell'inibizione della contrazione dell'organo provocata dal composto agonista di riferimento WIN 55,212-2.

### 3.7 Permeabilità alla barriera ematoencefalica: modelli *in silico*

La barriera emato-encefalica (Brain/Blood Barrier, BBB) è la principale interfaccia tra il sistema nervoso centrale e la circolazione periferica. Le caratteristiche chimico-fisiche che influenzano in modo determinante il passaggio della BBB mediante trasporto passivo sono la lipofilità, la capacità di formare legami idrogeno, il rapporto pKa/carica e le dimensioni della molecola. Si deve però tenere conto anche di quelli che sono i meccanismi di trasporto attivo, che in genere dipendono da un riconoscimento specifico della molecola e dalla sua concentrazione al trasportatore. Inoltre la permeabilità della BBB è influenzata da altri fattori quali l'assorbimento, il metabolismo di primo passaggio, la distribuzione negli altri tessuti e i percorsi di eliminazione. Un metodo comune per misurare il grado di penetrazione della BBB è il rapporto tra la concentrazione del composto in esame nel cervello e quella nel sangue, generalmente espressa in termini logaritmici e solitamente indicata come logBB.

$$\log BB = \log(C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}})$$

I valori sperimentali del logBB pubblicati finora coprono un range che va da +2.00 a -1.00 [65-67].

Lipinski nel 1997 [66] ha formulato cinque regole empiriche per la predizione del passaggio della BBB. Un composto è facilmente BBB-permeabile se rispetta i seguenti cinque parametri:

- 1) deve possedere un  $\log BB \geq 0.3$ ;
- 2) il valore dell'area della superficie polare di una molecola (PSA) deve essere inferiore ai 70 Å<sup>2</sup>;
- 3) il peso molecolare deve mantenersi sotto i 450 Da;
- 4) il numero totale di atomi di ossigeno e azoto (N+O) deve essere  $\leq 5$ ;

5) deve essere verificata la relazione  $CLogP - (N+O) > 0$ .

Quindi composti con  $\log BB \geq 0.3$  attraversano agevolmente la BBB, mentre i composti con  $\log BB < -1$  sono scarsamente distribuiti nel cervello. La permeabilità di composti con  $\log BB$  compresa tra  $-1$  e  $0.3$  non è facile da predire [67]. La determinazione del  $\log BB$  richiede molto tempo e risorse, soprattutto, per gli esperimenti *in vivo*. Questo presuppone che tutti i prodotti da valutare debbano essere sintetizzati per essere testati. In questi ultimi anni hanno preso piede sempre più modelli predittivi della permeabilità alla BBB *in silico* per la loro velocità, flessibilità, basso costo e minore richiesta di tempo in confronto agli approcci *in vivo* e *in vitro*. Pertanto anche per il NESS06SM si è sviluppato un nuovo approccio basato sulla simulazione computazionale e predizione delle interazioni con l'interfaccia della BBB per velocizzare e razionalizzare il suo design [67]. La propensione di NESS06SM di attraversare la BBB è stata preliminarmente valutata sulla base dei seguenti parametri: lipofilia attraverso il coefficiente di ripartizione ottanolo /acqua (cLogPOW), l'area topologica della superficie polare (tPSA), e il rapporto tra le concentrazioni allo stato stazionario di la molecola nel cervello e nel sangue, di solito espressa come  $\log (C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}})$  o, più semplicemente,  $\log BB$ . Tutti questi parametri sono stati contemporaneamente valutati anche sul rimonabant. I valori di cLogPOW, tPSA e  $\log BB$  del NESS06SM sono stati calcolati *in silico* utilizzando algoritmi basati sulle proprietà fisico-chimiche del composto e basati sulla sua struttura chimica utilizzando MarvinSketch 5.11.3 (ChemAxon Ltd.) accessibile tramite Internet (<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>).

### 3.8 Variazione della temperatura corporea

Al fine di confermare i dati raccolti sulla permeabilità del NESS06SM con i sistemi di simulazione computazionale, si è valutata l'azione del antagonista neutro sulla termoregolazione. Come detto in

precedenza una delle azioni dei cannabinoidi agonisti a livello dell'ipotalamo è quella di generare ipotermia in vivo [68]. I composti con attività CB1 antagonista, o agonista inverso, e che passano la BBB devono essere in grado di bloccare l'azione del agonista ripristinando i livelli fisiologici di temperatura. Allo scopo di avere una conferma sulla permeabilità verso la BBB del NESS06SM, è stata valutata la proprietà termoregolatrice rispetto al rimonabant dopo un trattamento in vivo con WIN 55,212-2 [69].

Per i test sono stati utilizzati topi maschi CD1 (Charles River, Italia), alloggiati 20 per gabbia in condizioni di stabulazione standard (temperatura  $22 \pm 2^\circ$  C, umidità relativa 60%, illuminazione artificiale con ciclo luce buio di 12 ore). Cibo e acqua sono stati disponibili ad libitum. La temperatura rettale, è stata misurata attraverso un termometro elettronico inserito ad una profondità di 2 mm. Le misure sono state effettuate su topi acclimatati per almeno un'ora. La temperatura rettale è stata determinata prima a condizioni basali, in un secondo tempo a 3 gruppi sperimentali è stato somministrato WIN 55,212-2 4mg/kg (Tocris Bioscience, UK) e successivamente a un gruppo il rimonabant e ad un altro il NESS06SM. Le misure della temperatura rettale sono state effettuate ogni 30 minuti fino ai 120.

### **3.9 Comportamento alimentare**

L'attività sperimentale sul comportamento alimentare è stata indirizzata all'individuazione del modello animale che rispecchi il più possibile le modificazioni metaboliche e comportamentali riscontrate nell'obesità umana. Tra i modelli animali utilizzati nello studio dell'obesità si hanno i topi obesi C57BL/6J ob/ob o i C57BL/6J db/db corrispondenti ad animali carenti di leptina nel primo caso e carenti del recettore alla leptina nel secondo caso. Sono estesamente utilizzati in letteratura come modello di obesità monogenica, ma si tratta di un modello limitato in quanto nell'uomo l'obesità è per lo più una patologia multifattoriale e non dipendente da un solo gene. Per

questa tesi è stato selezionato un modello animale di obesità che rappresenta un avanzamento rispetto ai modelli genetici utilizzati finora: i topi DIO (diet induced obesity). Questo modello si basa sull'induzione dell'obesità in topi C57BL/6N tramite l'esposizione per almeno 4 settimane ad una dieta iperlipidica. Il modello è ritenuto più valido in quanto mima al meglio lo sviluppo del sovrappeso e dell'obesità osservata nell'uomo. Per minimizzare gli effetti ormonali dell'estro sul consumo di cibo e l'aumento di peso si è scelto di utilizzare per tutta la sperimentazione *in vivo* topi maschi.

Al fine di valutare l'azione del composto NESS06SM sul comportamento alimentare è stato eseguito un trattamento acuto preliminare per valutare gli effetti del composto sul food intake e valutare la dose minima efficace rispetto al composto di riferimento, in animali C57BL/6N. Gli animali dopo 18 ore di digiuno sono stati sottoposti a trattamento (i.p.) con rimonabant 3 mg/kg e NESS06SM, 3, 10, 20 mg/kg, dopo 15 minuti è stato somministrato il cibo e monitorato il consumo nelle 3 ore successive. È stato ripetuto lo stesso modello acuto sullo stesso ceppo di animali ma obesi, C57BL/6N-DIO (topi-DIO).

Una volta scelta la dose è stato eseguito un trattamento cronico di 30 giorni su 60 topi maschi C57BL/6N DIO di 10 settimane, con un peso di circa 30-40 g, acquistati da Charles River (Calco, Lecco, Italia). Gli animali sono stati alloggiati individualmente in gabbie di plastica mantenute a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $55 \pm 15\%$  di umidità relativa, e mantenuti su un ciclo luce/buio invertito (12 ore di luce e 12 ore di buio). C57BL/6N DIO hanno seguito un periodo di acclimatazione e abituamento ai nostri laboratori per almeno una settimana e hanno ricevuto una dieta ad alto contenuto calorico, in particolare iperlipidica (Dieta D12492: 60% di grassi, 20% carboidrati, 20% proteine, totale 5.24 kcal/g; Research Diets Inc, New Brunswick). Dopo il periodo di acclimatazione, i topi C57BL/6N DIO sono stati pesati e assegnati random a differenti gruppi sperimentali ( $n = 12$ ). Il gruppo di controllo, VH FD, è costituito da topi DIO alimentati con la dieta iperlipidica e trattati col solo

veicolo con cui si costituiscono i farmaci per il trattamento (twin 20 in soluzione fisiologica, 1:10). Un altro gruppo di controllo, VH ND, è costituito da topi DIO sottoposti a un cambio di dieta, infatti questi animali dopo essere stati alimentati con una dieta ipercalorica passano a una normocalorica (D12450B, Research Diets Inc., New Brunswick) costituita dal 10% di grassi, 70% da carboidrati e il 20% da proteine, per un totale di 3.85 kcal/g. Anche questi animali vengono trattati con veicolo. Il gruppo di topi DIO N06SM10 FD , è costituito da animali nutriti con una dieta ipercalorica e trattati con NESS06SM, 10 mg/kg/giorno, il secondo gruppo, N06SM30 FD, alimentato sempre con una dieta iperlipidica, ed esposti a 30 mg/kg/giorno di NESS06SM. Il terzo e ultimo gruppo di animali, rimonabant FD, è composto da topi DIO alimentati con una dieta iperlipidica e sottoposti a 10 mg/kg/giorno di rimonabant.

Il dosaggio del rimonabant è stato scelto secondo i nostri dati precedentemente pubblicati [70,71], mentre la dose scelta per il NESS06SM è derivata dall'analisi dei valori di  $K_i$  per il recettore CB1 confrontata con quella del composto di riferimento. Tutta la sperimentazione animale è stata eseguita seguendo le linee guida UE per la cura e l'uso di animali da laboratorio (CEE N ° 86/609).

Giornalmente sono stati registrati: il peso corporeo individuale, l'apporto calorico (g consumo di cibo per kcal/g), inoltre settimanalmente è stata misurata la lunghezza del corpo per il calcolo del Body Mass Index (BMI).

Alla fine del periodo di trattamento (31 giorni) sono stati raccolti campioni di sangue dal seno orbitale per la valutazione dei parametri biochimici. Inoltre sono stati rimossi, pesati e immediatamente conservati a  $-80^{\circ}$  C campioni di fegato, tessuto adiposo bianco e bruno e isolate aree cerebrali quali: ipotalamo, corteccia prefrontale, amigdala, nucleo accumbens, ippocampo per gli studi di espressione genica sull'RNA.

### **3.10 Analisi ematiche**

Il sangue una volta prelevato è stato centrifugato a 1000g per 10 minuti e sul siero sono stati misurati i livelli di trigliceridi (TG), glucosio (GLU), colesterolo totale (CHO), transaminasi GOT e GPT col kit colorimetrico e il KEYLAB LiquiVet® Analyzer (BPC BioSed srl, Castelnuovo di Porto, Roma, Italy)

### **3.11 Espressione genica**

RNA totale dai diversi distretti cerebrali, dal fegato e dal tessuto adiposo sono stati estratti secondo la metodica di Chomczynsky and Sacchi [72], utilizzando il reagente Trizol e DNasi I (Life Technologies, Milano), contenente una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, in accordo con le istruzioni del prodotto. 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), sono stati centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C. La miscela, dopo centrifugazione, si è separata in 3 fasi: una rossa contenente il fenolo e il cloroformio, un'interfase e una fase acquosa posta superiormente, contenente l'RNA che è stata prelevata e trasferita in nuovi tubi. La precipitazione dell'RNA è stata effettuata tramite aggiunta di isopropanolo (0.5 ml per 1 ml di Trizol) e centrifugazione per 10 minuti a 12000g 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 7500g per 5 minuti a 4°C. Il pellet di RNA è stato quindi risospeso in acqua RNAsi free (Invitrogen) e sottoposto a lettura spettrofotometrica a 260, 280 e 320 nm.

In seguito a digestione con DNase I, l'RNA (0.5 µg) è stato retrotrascritto utilizzando il kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (Life Technologies, Milano).

Real-time PCR è stata eseguita utilizzando sistemi di espressione genica validati TaqMan® MGB probe per assicurare la specificità dei geni analizzati specifici per il topo. La β-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, AB, Foster City, 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 min, 50 cicli a 95°C per 15 s and 60°C per 1 min. I geni studiati sono riportati nella tabella 1. Quantificazione relativa è stata eseguita utilizzando il metodo comparativo C(T) indicato anche come il metodo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

GENI	TESSUTI
<i>Cannabinoid receptor 1</i> , Mm00432321_s1, CB1	Ipotalamo, Nucleus accumbens, Amigdala, Corteccia prefrontale, Ippocampo, Fegato, Grasso bianco
<i>Neuropeptide Y</i> , Mm00445771_m1, NPY	Ipotalamo
<i>Agouti-related protein</i> , Mm00475829_g1, AGRP	Ipotalamo
<i>Cocaine and amphetamine regulated transcript</i> , Mm00489086_m1, CART	Ipotalamo
<i>Proopiomelanocortin</i> , Mm00435874_m1, POMC	Ipotalamo
<i>Insulin receptor</i> , Mm00439694_m1, INS-R	Ipotalamo
<i>Leptin receptor</i> , Mm 00440181_m1, LEP-R	Ipotalamo
<i>Serotonin transporter</i> , Mm00439391_m1, SERT	Nucleus accumbens, Amigdala, Corteccia prefrontale
<i>Norepinephrine transporter</i> , Mm00436661_m1, NET	Nucleus accumbens, Amigdala, Corteccia prefrontale
<i>Dopamine transporter</i> , Mm00438388_m1, DAT	Nucleus accumbens, Amigdala, Corteccia prefrontale
<i>Brain derived neurotrophic factor</i> , Mm04230607_s1, BDNF	Ippocampo
<i>Nerve growth factor</i> , Mm00443039_m1, NGF	Ippocampo
<i>Adiponectin</i> , Mm01343606_m1, ADIPOQ	Grasso bianco
<i>Leptin</i> , Mm 00434759_m1, LEP	Grasso bianco
<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i> , Mm01184322_m1, PPAR-γ	Grasso bianco
<i>Fatty acid amide hydrolase</i> , Mm00515684_m1, FAAH	Grasso bianco
<i>Fatty acid synthase</i> , Mm00662319_m1, FAS	Grasso bianco, Fegato
<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i> , Mm00440939_m1, PPAR-α	Fegato
<i>Glucokinase</i> , Mm01183091_m1, GLUK	Fegato
<i>Pyruvate kinase</i> , Mm00443090_m1, PYK	Fegato

**Tabella 1.** Oligonucleotidi TaqMan® MGB con l'assay ID dei geni utilizzati per la PCR-real-time semi-quantitativa.

### **3.12 Statistica**

Tutti i dati della sperimentazione *in vivo*, delle analisi ematiche e dell'espressione genica sono espressi come media  $\pm$  SEM (n = 12). Per determinare la significatività degli effetti farmacologici sul peso corporeo e l'apporto calorico durante il trattamento cronico è stato utilizzato il test ANOVA a due vie per Misure ripetute seguito dall'analisi post-test di Bonferroni. Il test statistico ANOVA a una via con un'analisi post-test di Newman-Keuls è stato invece adottato per determinare le differenze significative nei test sull'attivazione recettoriale, nella variazione del peso corporeo, della massa grassa, del BMI e del consumo calorico totale, tra i parametri biochimici ematici, tra i livelli di espressione di mRNA di geni nel SNC e nei tessuti periferici. L'analisi statistica dei saggi di binding con ( $^{35}$ S) GTP $\gamma$ S è stata fatta con il test di ANOVA a una via un'analisi post-test di Bonferroni, confrontando i valori di stimolazione media  $\% \pm$  SEM ai valori basali di binding (0.0 % di stimolazione). Tutte le analisi statistiche e le elaborazioni grafiche sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism versione 5.00 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **4. RISULTATI**

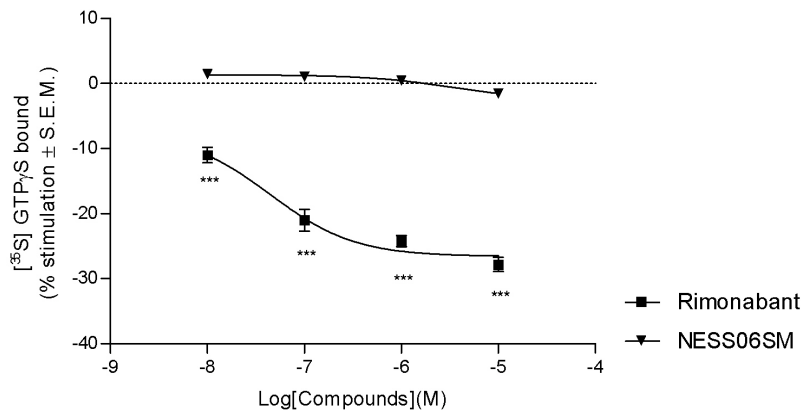
### **4.1 NESS06SM: affinità, attività intrinseca e tossicità**

L'affinità del NESS06SM è mostrata in tabella 2 ed è stata identificata in un precedente lavoro sperimentale [73]. Per quanto riguarda invece l'attività intrinseca del nuovo composto di sintesi, sono stati eseguiti i test ( $^{35}$ S) GTP $\gamma$ S sul recettore CB1. È stato infatti riportato che gli agonisti CB1 inducono una stimolazione del GTP $\gamma$ S grazie al legame con le proteine G accoppiate al recettore [74,75]. La rappresentazione dell'attività intrinseca ( $^{35}$ S) GTP $\gamma$ S è rappresentata dal fit

della curva concentrazione-risposta, di forma sigmoidale, la cui pendenza aumenta con l'aumentare della concentrazione dell'agonista puro. Al contrario le curve rappresentate dagli antagonisti puri mostrano un andamento che è spostato a destra rispetto a quelle degli agonisti. Infine gli agonisti inversi invece generano un effetto opposto agli agonisti puri determinando valori percentuali negativi. L'effetto indotto da differenti concentrazioni di NESS06SM sull'attività intrinseca (<sup>35</sup>S) GTPγS è riportato in Figura 3. I risultati, espressi come percentuale della stimolazione vs basale ± SEM, vengono confrontati con quelli ottenuti con il rimonabant. Il rimonabant mostra un comportamento da agonista inverso dando luogo ad una riduzione significativa del binding recettoriale (<sup>35</sup>S) GTPγS a concentrazioni superiori a 10<sup>-8</sup> M. Nessun effetto è stato rilevato con l'antagonista neutro, NESS06SM, almeno fino a 10<sup>-5</sup> M ( $F_{\text{interaction}} (6, 48) = 28.0, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{drugs}} (2, 48) = 1110.0, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{doses}} (3, 48) = 43.9, p < 0.0001$ ).

<b>Molecola</b>	<b>Ki CB1 (nM)</b>	<b>Ki CB2 (nM)</b>	<b>CB1/CB2</b>
<b>NESS06SM</b>	10.3 ± 0.2	> 5000	~0.002
<b>Rimonabant</b>	1.8 ± 0.1	514.1 ± 5.2	0.003

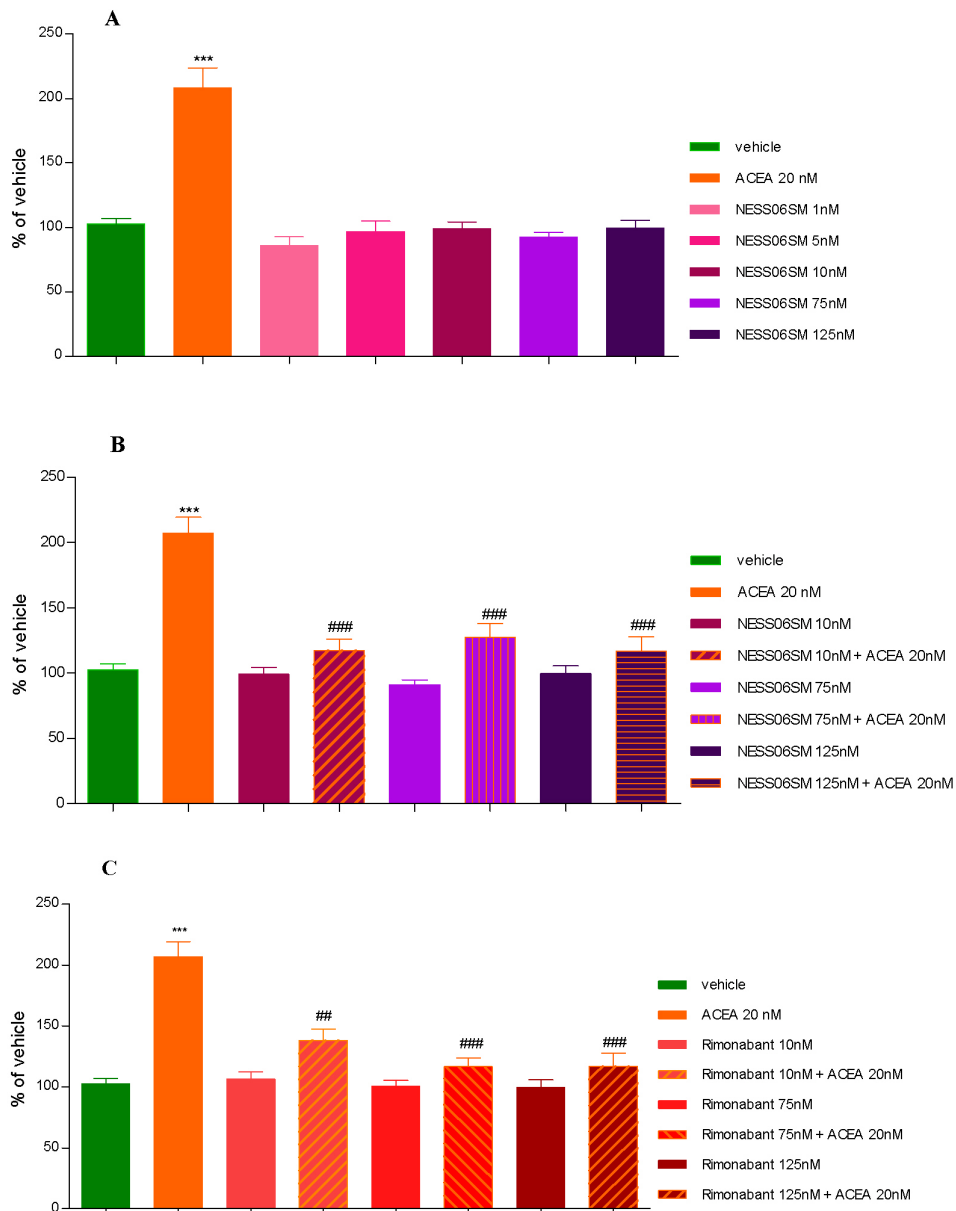
**Tabella 2.** Valori di Ki tratti da Novel pyrazole derivatives as neutral CB1 antagonists with significant activity towards food intake. Eur J Med Chem 2013 [73]



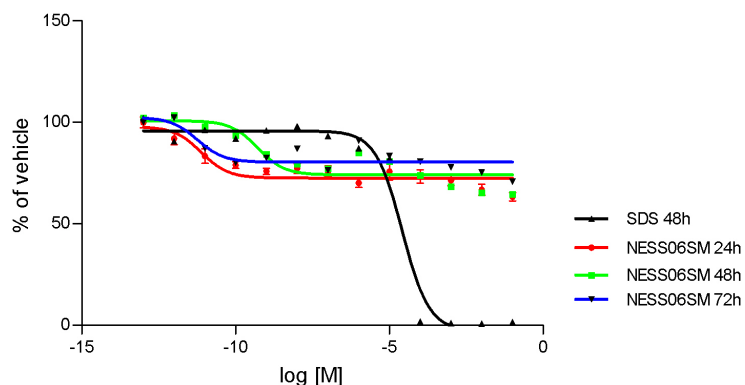
**Figura 3.** Effetto del rimonabant e NESS06SM sull'attività  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  CB1 in cellule CHO. Le cellule sono state incubate con differenti concentrazioni di ciascun composto cannabinoide singolarmente. I valori di binding  $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  sono stati determinati dai dati sperimentali a cui son stati sottratti i valori basali di binding. I risultati sono stati ottenuti e riportati come media  $\pm$  SEM da cinque esperimenti indipendenti, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

Anche dai dati raccolti col Western Blot è confermata la scarsa o nulla azione del NESS06SM sull'attivazione recettoriale. Infatti come si vede in Figura 4 il trattamento con il NESS06SM non ha determinato alcuna attivazione recettoriale, 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. I risultati ottenuti dimostrano quindi un'attività antagonista sul recettore CB1 da parte del NESS06SM solo in presenza dell'agonista.

Prima che qualsiasi composto, potenzialmente farmaceutico, possa passare dal *vitro* al *vivo* è necessario stabilire se è tossico, e soprattutto a quale dose è tossico. I dati raccolti in Figura 5 sulla tossicità cellulare non ha evidenziato alcuna citotossicità del nuovo composto in esame. Infatti, nonostante il fit mostri una leggera flessione le cellule mantengono una vitalità dell'80% anche dopo 72 ore di trattamento.



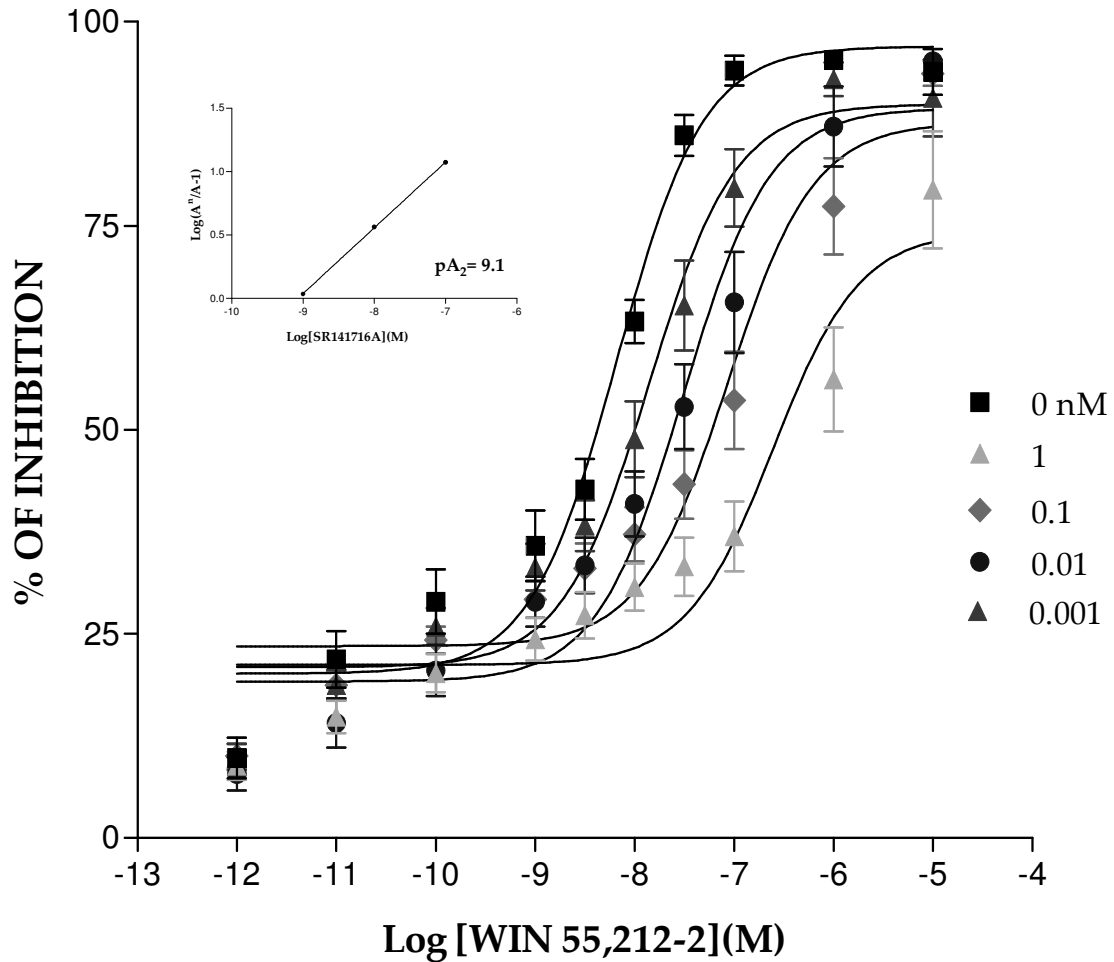
**Figura 4.** Effetto del NESS06SM sull'attivazione recettoriale, mediante la quantificazione dell'espressione della proteina Erk1/2 in linee cellulari di neuroblastoma di topo N1E-115, che esprimono selettivamente i recettori cannabinoidergici di tipo CB1. Dai dati in figura si evince che il composto NESS06SM non mostra nessuna attività intrinseca capace di attivare il recettore CB1 (A). Allo stesso tempo mostra la sua capacità antagonista quando in presenza dell'agonista ACEA, smorzandone significativamente la risposta (B), come mostrastro anche dal composto di riferimento, rimonabant, (C). I risultati sono stati ottenuti e riportati come media %  $\pm$  SEM rispetto al veicolo. \*\*\*  $p < 0.001$  vs veicolo, ###  $p < 0.001$  vs ACEA, ##  $p < 0.01$  vs ACEA.



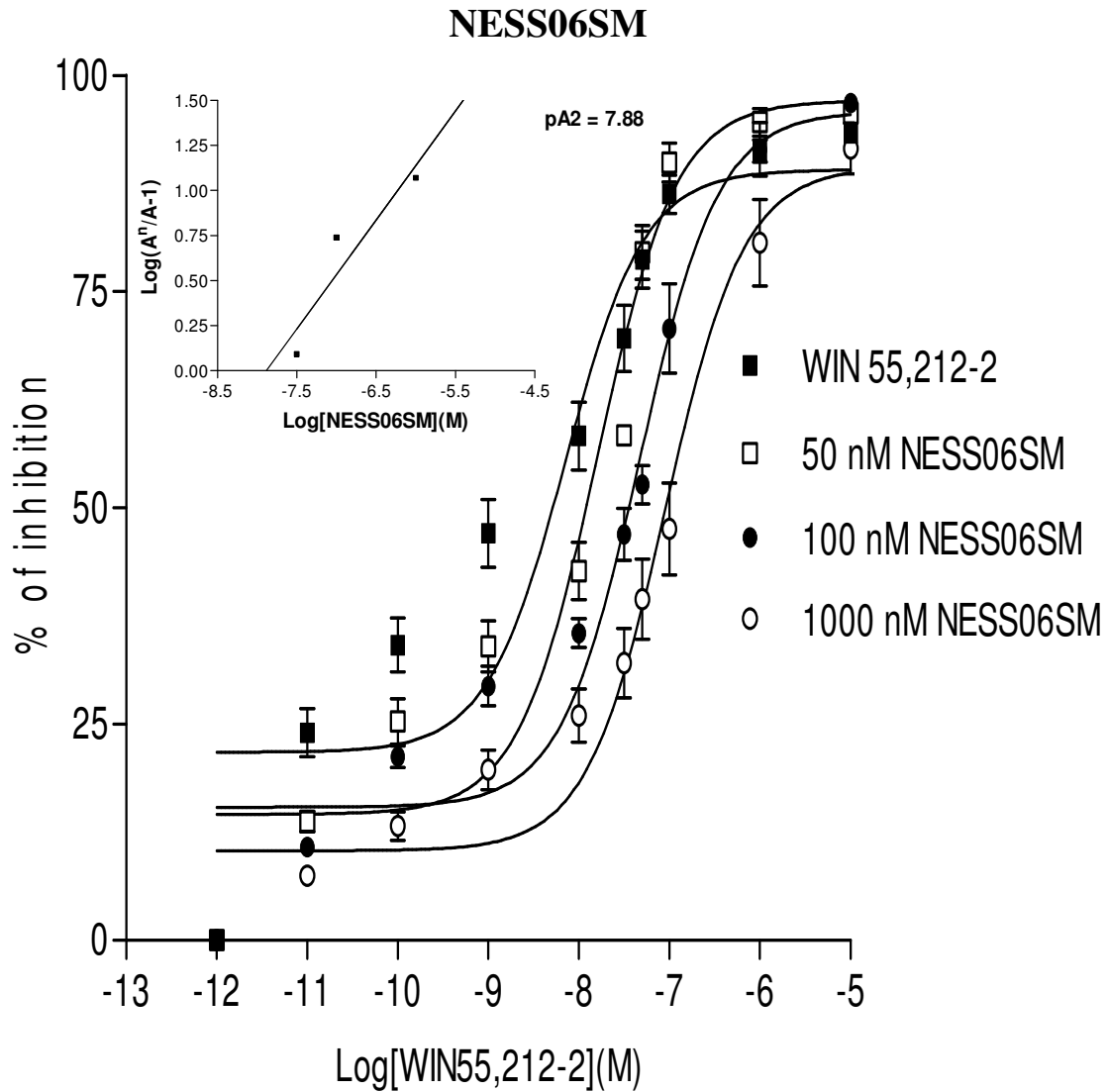
**Figura 5.** Effetto dose risposta relativo all'esposizione delle cellule di neuroblastoma di topo N1E-115 a diverse concentrazioni ( $10^{-13}$ ÷ $10^{-1}$  M) del composto NESS06SM e del composto di riferimento SDS per 24, 48 e 72 ore. Ogni concentrazione del composto è stata testata sulle cellule in triplicato. In tutti e tre gli intervalli la vitalità si mantiene sopra il 60%. L'EC50 dell'SDS è pari a  $2.5E-5$  con una vitalità del 1-0% circa.

I dati raccolti con il Western blot sulle linee cellulari di neuroblastoma di topo N1E-115, modello *in-vitro*, è stato confermato con dei test sul modello degli *organi isolati*, il quale ha permesso di comprendere meglio l'azione antagonista del NESS06SM in un sistema *ex-vivo*. Le curve dose-effetto per i nuovi derivati sono state determinate in presenza di concentrazioni crescenti di agonista competitivo. I risultati riportati in Figura 6 hanno evidenziato l'attività antagonista del NESS06SM nei confronti dei recettori CB1. Inoltre si può osservare in Figura 7 come la capacità del rimonabant di antagonizzare l'effetto del WIN 55-212-2 sia maggiore rispetto al nuovo composto, in particolare l'attività antagonista è riscontrabile già a concentrazioni di almeno un ordine di grandezza inferiore. Lo Schild plot è stato utilizzato per il calcolo della  $pA_2$  attraverso il quale è stata espressa la potenza relativa a ciascuna molecola testata.

## Rimonabant



**Figura 6.** Curve concentrazione-risposta di WIN 55,212-2 sull'inibizione delle contrazioni indotte da una stimolazione elettrica, in presenza di DMSO (■, veicolo) e in presenza del rimonabant alle concentrazioni di 1nM (▲), 0.1 nM (◆), 0.01nM (●), 0.001 nM (▲). Ciascun simbolo rappresenta i valori medi  $\pm$  S.E.M. delle contrazioni del vaso deferente evocate elettricamente calcolate come percentuale rispetto alla risposta contrattile misurata prima dell'aggiunta del WIN 55,212-2. Il rimonabant è stato aggiunto 20 minuti prima dell'aggiunta dell'agonista. I valori di  $pA_2$  son stati calcolati con l'analisi di regressione di Schild [76].



**Figura 7.** Curve concentrazione-risposta di WIN 55,212-2 sull'inibizione delle contrazioni indotte da una stimolazione elettrica, in presenza di DMSO (■, veicolo) e in presenza del NESS06SM alle concentrazioni di 50 nM (□), 100 nM (●), 1000 nM (○). Ciascun simbolo rappresenta i valori medi  $\pm$  S.E.M. delle contrazioni del vaso deferente evocate elettricamente calcolate come percentuale rispetto alla risposta contrattile misurata prima dell'aggiunta del WIN 55,212-2. Il NESS06SM è stato aggiunto 20 minuti prima dell'aggiunta dell'agonista. I valori di  $pA_2$  son stati calcolati con l'analisi di regressione di Schild [76].

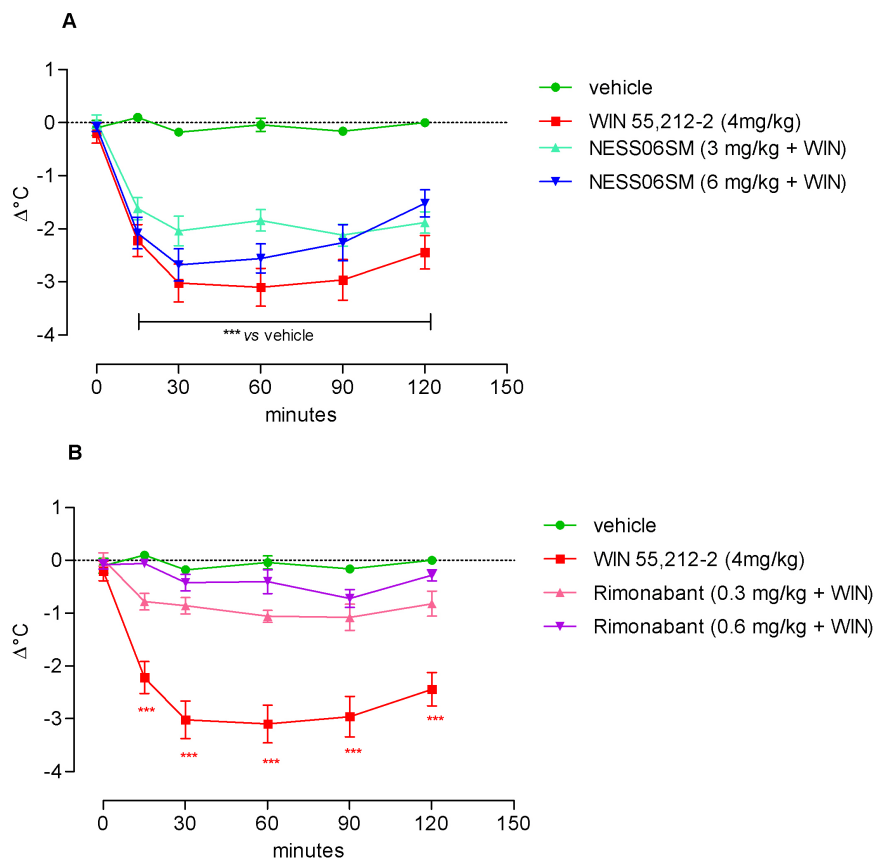


## 4.2 NESS06SM: Permeabilità

La capacità del NESS06SM di attraversare la barriera ematoencefalica, e quindi la sua permeabilità, è stata valutata incrociando i dati ottenuti dalle simulazioni informatiche con quelli osservati sulla variazione della temperatura corporea a livello rettale. Infatti è noto che l'ipotalamo, sede dei centri termoregolatori, è ricco di recettori CB1 capaci, se attivati, di abbassare la temperatura corporea. Un antagonista che attraversa la BBB è capace di bloccare quest'azione ripristinando livelli di temperatura corporea. I modelli chimico-informatici riportati in Tabella 3, mostrano una scarsa lipofilia ( $c\text{LogP}_{\text{OW}} = 4.62$ ), un valore più alto di tPSA ( $t\text{PSA} = 59.39$ ), e soprattutto un valore minore di log BB ( $\log\text{BB} = -0.038$ ). Questi dati di simulazione sono confermati da quelli osservati in vivo sulla temperatura rettale. Il NESS06SM non è capace di contrastare il decremento della temperatura corporea rettale nell'animale indotta dall'agonista WIN 55,212-2 (Figura 8A). Al contrario questo effetto è nettamente marcato in tutti gli animali che ricevono rimonabant (Figura 8B).

<b>Molecola</b>	<b>cLogP<sub>OW</sub></b>	<b>tPSA</b>	<b>log BB</b>
<b>NESS06SM</b>	4.62	59.39	-0.038
<b>rimonabant</b>	5.36	50.16	0.211

**Tabella 3.** La capacità del NESS06SM di attraversare la BBB è stata valutata sulla base dei parametri: lipofilia attraverso il  $c\text{LogP}_{\text{OW}}$  (coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua), l'area topologica di superficie polare (tPSA), e il rapporto tra le concentrazioni di stato stazionario della molecola farmaco nel cervello e nel sangue, di solito espressa come  $\log (C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}})$  o, più semplicemente, log BB.

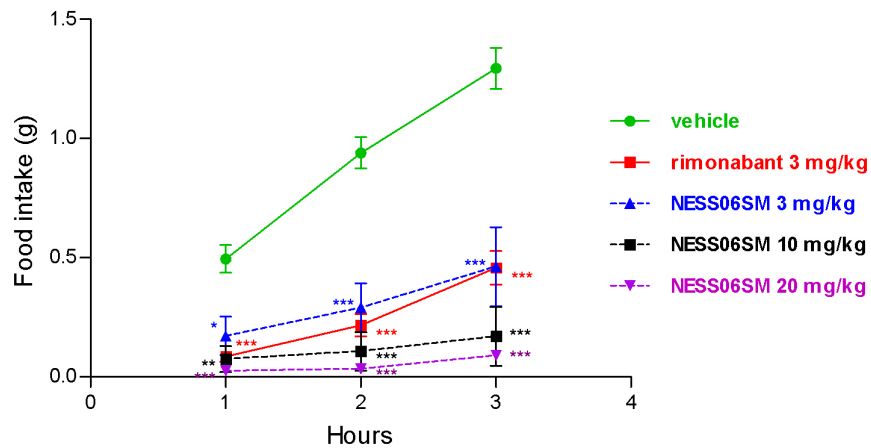


**Figura 8.** Time course dell'ipoteremia indotta dal WIN 55,212-2 (4mg/kg, i.p.) in combinazione con NESS06SM (A, 3mg/kg, 6mg/kg, i.p.) o con rimonabant (B, 0.3mg/kg, 0.6mg/kg, i.p). I dati sono espressi come variazione della temperatura corporea  $\Delta T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) rispetto ai valori basali ( $37^{\circ}\text{C}$ ).

### 4.3 NESS06SM: variazione del peso corporeo, BMI, tessuto adiposo

Una volta stabilita l'affinità, l'attività intrinseca e soprattutto la tossicità *in vitro* del nuovo composto di sintesi si è passati al modello *in vivo* di obesità. I topi utilizzati, C57BL/6N DIO, prima di iniziare il trattamento farmacologico presentavano una conclamata obesità, il loro peso era di  $36.7 \pm 4.2$  grammi. Questo ceppo di topi con una dieta normale alla decima settimana hanno un peso che oscilla tra i 16 e i 20 grammi, i topi DIO, alimentati con una dieta ipercalorica possono

incrementare il loro peso più del 40%. Prima del trattamento cronico è stato eseguito un trattamento in acuto, con una somministrazione intraperitoneale che ha dimostrato un'inibizione del food intake sia nei topi DIO che nel ceppo alimentato con una dieta normocalorica (Figura 9). L'effetto lo si osserva già alla dose di 3mg/kg e viene mantenuto nelle 3 ore successive come nel rimonabant ( $F_{\text{interaction}}(8, 87) = 4.3, p=0.0002$ ;  $F_{\text{treatment}}(4, 87) = 75.2, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{hours}}(2, 87) = 19.2, p < 0.0001$ ).



**Figura 9.** Time course dell'azione del NESS06SM (3, 10, 20 mg/kg, i.p.) e del rimonabant (3 mg/kg, i.p.) su topi C57BL/6J DIO di 10 settimane. Il protocollo sperimentale ha previsto 18 ore di digiuno seguite dal trattamento farmacologico e dopo 15 minuti è stato somministrato il cibo pesato e monitorato nelle 3 ore successive. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, le significatività sono state calcolate verso il veicolo, \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.01$ .

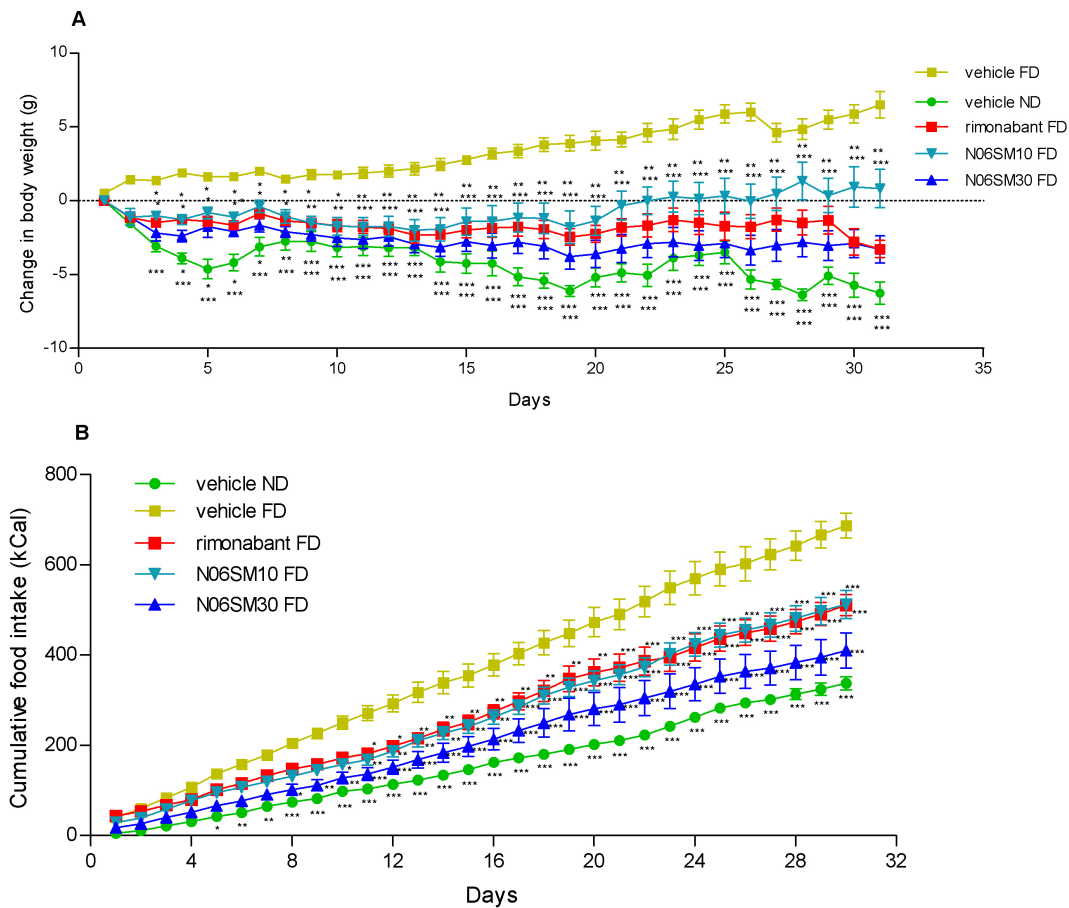
Successivamente al trattamento in acuto si è passati a testare il nuovo farmaco in cronico per valutare su un lungo periodo tutte le trasformazioni metaboliche a cui gli animali obesi sarebbero andati incontro. Infatti, come mostrato in Figura 10, l'effetto della somministrazione sia del rimonabant che del NESS06SM, genera una diminuzione del peso corporeo paragonabile a quello indotto dal cambio di dieta, con significative differenze rispetto ai topi DIO trattati col veicolo e

alimentati con FD ( $F_{\text{interaction}} (120, 868) = 10.68, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{treatment}} (4, 868) = 59.2, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{days}} (30, 868) = 2.1, p = 0.0003$ ). Inoltre c'è da sottolineare che gli effetti significativi del trattamento e del cambio di dieta sono osservabili a partire dal terzo giorno e che entrambi i dosaggi del NESS06SM hanno determinato una significativa riduzione del peso.

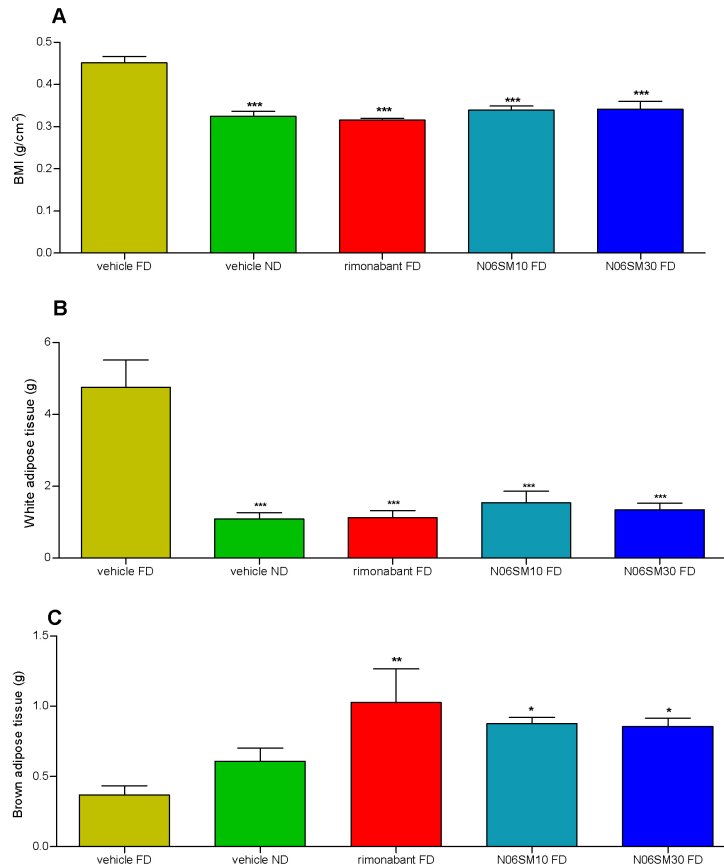
Durante i 31 giorni di trattamento è stato valutato anche il consumo di cibo giornalmente, e trasformato in kcal giornaliere. La Figura 10B mostra il consumo cumulativo di cibo durante il trattamento cronico. I dati raffigurati evidenziano una marcata riduzione del consumo calorico durante il trattamento cronico nei gruppi sperimentali trattati con rimonabant e NESS06SM rispetto al VH FD a partire dall'8° - 11° giorno di trattamento. Anche in questo caso l'effetto rilevato è sovrapponibile a quello evidenziato negli animali DIO alimentati con una dieta normale, anche se l'effetto ipofagico della dieta lo si osserva già a partire dal 5° giorno. Infatti il passaggio ad una dieta normocalorica (sicuramente poco *palatabile*) sembrerebbe non soddisfare i topi DIO rispetto alla dieta iperlipidica (molto *palatabile*) ( $F_{\text{interaction}} (116, 1140) = 3.3, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{treatment}} (4, 1140) = 464.7, p < 0.0001$ ;  $F_{\text{days}} (30, 1140) = 254.2, p < 0.0001$ ).

Durante l'intero periodo di trattamento agli animali viene anche misurata la distanza muso-ano settimanalmente, necessaria per calcolare il BMI dell'animale. Come mostrato in Figura 11 si ha una marcata riduzione del BMI nei gruppi sperimentali trattati con NESS06SM, col rimonabant, e in quelli alimentati con una dieta normale rispetto al gruppo sperimentale VH FD ( $F_{\text{treatment}} (5, 63) = 24.8; p < 0.0001$ ). Inoltre dopo il trattamento tutti i topi DIO vengono sacrificati, e isolati alcuni tessuti centrali e periferici. Tra i tessuti periferici viene prelevato il tessuto adiposo bianco e quello bruno e vengono pesati. I dati hanno evidenziato un decremento della massa grassa bianca in termini di peso assoluto in tutti i gruppi sperimentali trattati e negli animali che ricevono veicolo e son alimentati con una dieta normo-calorica rispetto ai VH FD ( $F_{\text{treatment}} (4, 27) = 17.7; p < 0.0001$ ). Contemporaneamente possiamo osservare un significativo aumento del grasso bruno in tutti i gruppi

sperimentali trattati con rimonabant o NESS06SM rispetto al veicolo nutrito con dieta grassa. Il VH ND mostra un tendenziale incremento del tessuto adiposo bruno ma non statisticamente significativo ( $F_{\text{treatment}}(4, 31) = 19; p < 0.0001$ ).



**Figura 10.** Variazione del peso corporeo rispetto al giorno 0 (A), apporto calorico cumulativo (B) dopo il trattamento giornaliero con CB1 antagonisti. L'effetto della somministrazione del rimonabant (10mg/kg) e NESS06SM (10 mg/kg e 30 mg/kg) sul peso corporeo è sovrapponibile a quello indotto dalla dieta normo-calorica (VH ND), con differenze statisticamente significative rispetto ai topi trattati con veicolo e alimentati con dieta iper-lipidica (VH FD). Inoltre il rimonabant e il NESS06SM hanno indotto una significativa diminuzione del consumo calorico cumulativo rispetto al VH FD. I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. N = 12 per ciascun gruppo . \*\*\* p < 0.001 , \*\* p < 0.01 , \* p < 0.05 vs VH FD.



**Figura 11.** BMI (A), peso del tessuto adiposo bianco (B) e bruno (C), dopo trattamento con rimonabant, e NESS06SM. I dati evidenziano come il passaggio alla dieta normo-calorica, il trattamento con i CB1 bloccanti generi una riduzione statisticamente significativa del BMI e del tessuto adiposo bianco rispetto al gruppo sperimentale VH FD. Inoltre solo il trattamento farmacologico con rimonabant e NESS06SM genera un incremento del tessuto adiposo bruno. I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. N = 12 per ciascun gruppo. \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 vs VH FD.

#### 4.4 NESS06SM: parametri ematici

Dopo periodo di trattamento agli animali è stato prelevato il sangue per le analisi biochimiche ematiche riportate in Tabella 4. I risultati evidenziano una forte alterazione ematica in tutti gli animali alimentati con una dieta iper-lipidica ma non trattati farmacologicamente. In questo gruppo sperimentale si osserva infatti un'alterazione dei livelli di glucosio 162.3 mg/dL, trigliceridi 222.1

mg/dL, colesterolo 211.5 mg/dL, transaminasi GOT 107.9 U/L e GPT 125,5 U/L. Il passaggio alla dieta normo-calorica o il trattamento con rimonabant e NESS06SM ha generato un generale dimezzamento di questi valori rispetto al VH FD. Tra i parametri analizzati, i valori delle transaminasi si sono ridotte di circa un terzo alla fine del trattamento cronico nei gruppi sperimentali VH ND, e in quelli che hanno ricevuto il rimonabant o il NESS06SM rispetto al VH FD. È importante notare che entrambe le dosi NESS06SM hanno indotto un decremento dei valori sierici di GLU, CHO, TRI, e più marcatamente delle transaminasi GOT e GPT, rispetto agli animali che ricevono il veicolo e sono nutriti con la dieta iper-lipidica. Nessuna differenza significativa invece è stata evidenziata tra i gruppi sperimentali che ricevono il NESS06SM e quelli che ricevono il rimonabant. Nonostante il cambio di dieta (VH ND) porti ad un miglioramento generale dell'assetto ematico solamente nei gruppi trattati con i CB1 bloccanti si osserva una diminuzione dei trigliceridi superiore a quella generata dai veicoli ND. (GLU,  $F_{\text{treatment}}(4, 61) = 8.2, p < 0.0001$ ); CHO,  $F_{\text{treatment}}(4, 61) = 31.8, p < 0.0001$ ; TRI,  $F_{\text{treatment}}(4, 55) = 41.1, p < 0.0001$ ; GOT,  $F_{\text{treatment}}(4, 59) = 23.7, p < 0.0001$ ; GPT,  $F_{\text{treatment}}(4, 57) = 31.4, p < 0.0001$ ).

Serum parameters	VH FD	VH ND	Rimonabant 10 mg/kg	NESS06SM 10 mg/kg	NESS06SM 30 mg/kg
Glucose, mg/dL	162.3 ± 16.8	101.9 ± 5.2 **	92.8 ± 8.1 ***	100.8 ± 8.5 ***	88.2 ± 8.6 ***
Cholesterol, mg/dL	222.1 ± 15.2	118.4 ± 12.1 ***	94.0 ± 7.9 ***	93.9 ± 8.8 ***	84.5 ± 6.0 ***
Triglycerides, mg/dL	211.5 ± 12.3	139.2 ± 11.3 ***	96.5 ± 4.1 ***,##	101.6 ± 4.9 ***,#	87.9 ± 3.2 ***,##
Transaminase – GOT, U/L	107.9 ± 10.6	36.9 ± 2.8 ***	46.5 ± 4.2 ***	45.7 ± 4.4 ***	44.6 ± 4.4 ***
Transaminase – GPT, U/L	125.5 ± 12.5	36.7 ± 3.6 ***	39.4 ± 5.5 ***	44.5 ± 4.3 ***	31.5 ± 4.9 ***

**Tabella 4.** I campioni di sangue (300 µL, circa) sono stati raccolti dal seno orbitale e centrifugati a 1000g per 10 min. I livelli basali di glucosio, colesterolo, trigliceridi, transaminasi AST e ALT transaminasi di topi C57BL/6N erano 158.1 ± 9,6 mg/dL, 108.2 ± 9.4 mg/dL, 94.4 ± 8.3 mg/dL, 64.3 ± 2,5 U/L, 27.9 ± 7.6 U/L rispettivamente. I dati ottenuti con antagonisti CB1 sono confrontati con quelli dei gruppi VH FD

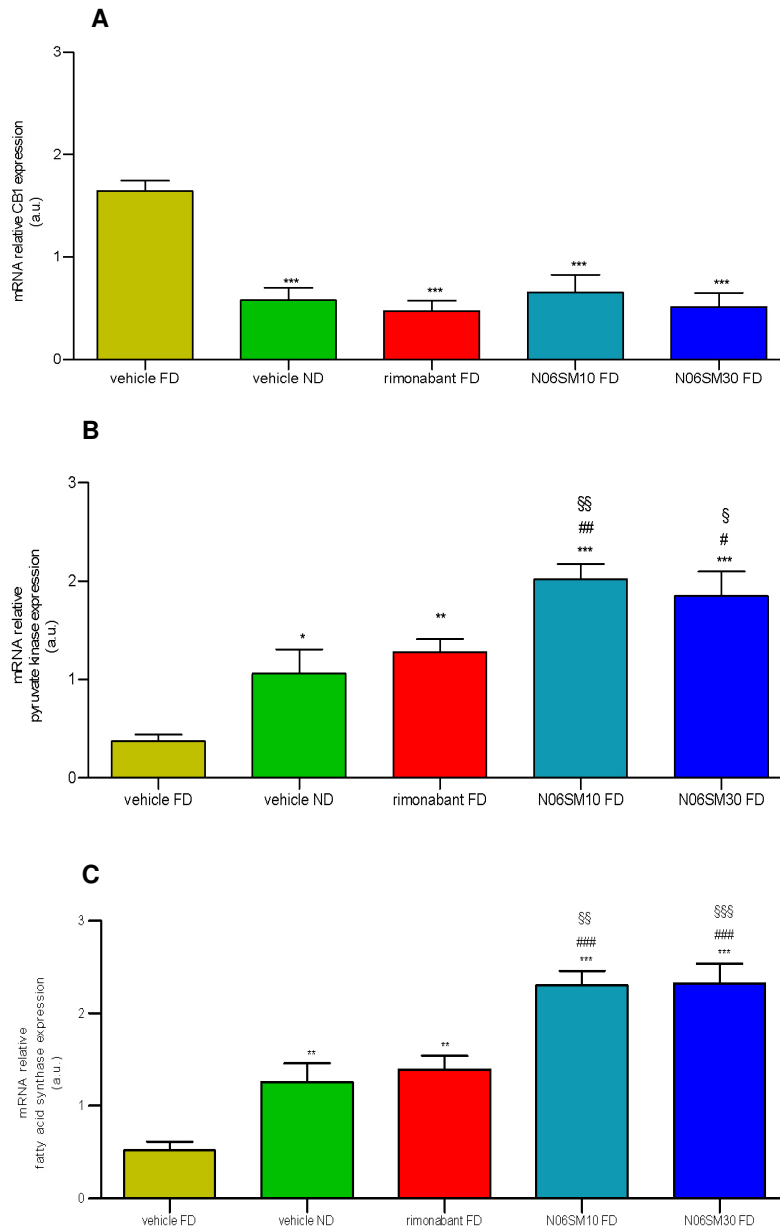
e VH ND. N = 12 per ciascun gruppo. I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM, le differenze statistiche sono state calcolate col test ANOVA a una via, col post test Newman-Keuls. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs VH FD; ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  vs VH ND.

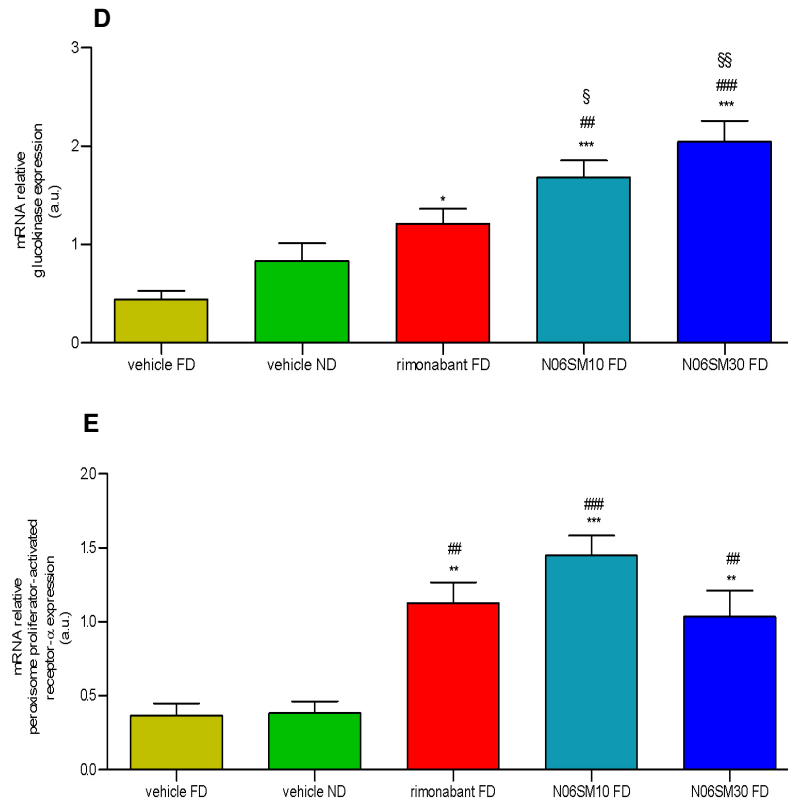
#### 4.5 Espressione genica nel fegato e nel tessuto adiposo

Come descritto in precedenza dopo il prelievo di sangue ogni animale è stato sacrificato e sono stati isolati alcuni tessuti periferici, in particolare, il tessuto adiposo e il fegato dai quali è stato estratto mRNA per gli studi di espressione genica. I geni analizzati, sono coinvolti nei meccanismi metabolici ed energetici del tessuto adiposo e del fegato, e hanno presentato un andamento tessuto specifico mediato dal recettore CB1. Infatti in entrambi i distretti si è osservato una diminuzione statisticamente significativa nell'espressione dell'mRNA del recettore CB1 (Figure 12A e 13A) nei gruppi sperimentali trattati e negli animali nutriti con una dieta normocalorica. Inoltre la dieta normo-calorica e il trattamento con CB1 bloccanti rispetto al gruppo sperimentale VH FD hanno determinato una *up-regulation* dell'mRNA degli enzimi epatici quali la piruvato chinasi (Figura 12B) ( $F_{\text{treatment}}(4, 53) = 12.8, p < 0.0001$ ), la sintetasi degli acidi grassi (Figura 12C) ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 19.4, p < 0.0001$ ), la glucochinasi (Figura 12D) ( $F_{\text{treatment}}(4, 57) = 11.9, p < 0.0001$ ) a cui si aggiunge l'*up-regulation* del recettore nucleare coinvolto nel metabolismo glucidico e lipidico, PPAR- $\alpha$  (Figura 12E) ( $F_{\text{treatment}}(4, 57) = 12.4, p < 0.0001$ ). Al contrario, nel tessuto adiposo gli animali trattati cronicamente con CB1 bloccanti hanno mostrato una *down-regulation*, rispetto ai topi DIO VH FD, degli enzimi metabolici lipidici e di quelli coinvolti nel sistema endocannabinoide come l'idrolasi dell'ammide dell'acido grasso (Figura 13B) ( $F_{\text{treatment}}(4, 51) = 12.8, p < 0.0001$ ), l'acido grasso sintasi (Figura 13C) ( $F_{\text{treatment}}(4, 50) = 13.5, p < 0.0001$ ) e il recettore nucleare PPAR- $\gamma$  ( $F_{\text{treatment}}(4, 48) = 5, p < 0.0001$ ) Figura 13D. Infine è stata valutata l'espressione dei mediatori di fame/sazietà rilasciati dal tessuto adiposo e "comunicanti" con l'ipotalamo: l'adiponectina e la

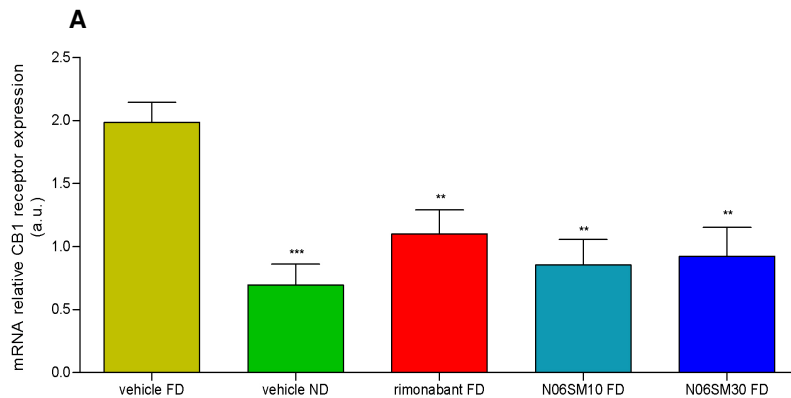


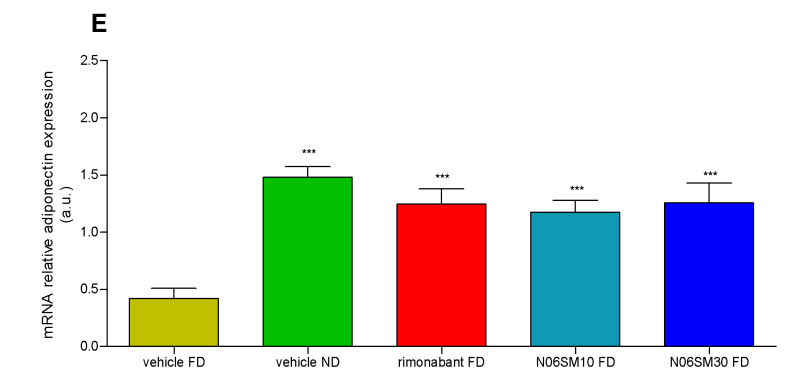
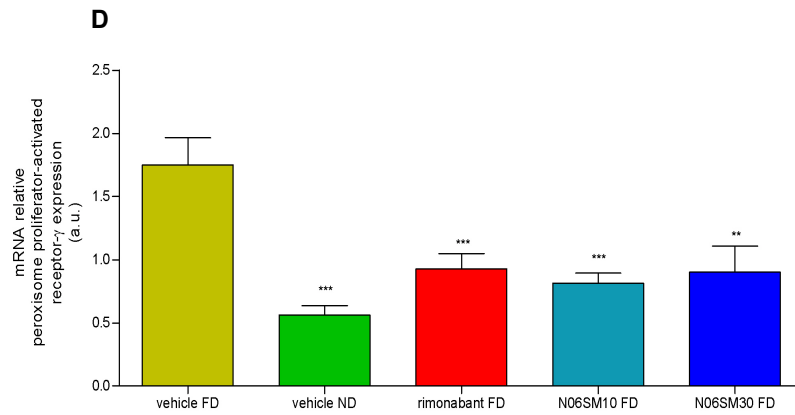
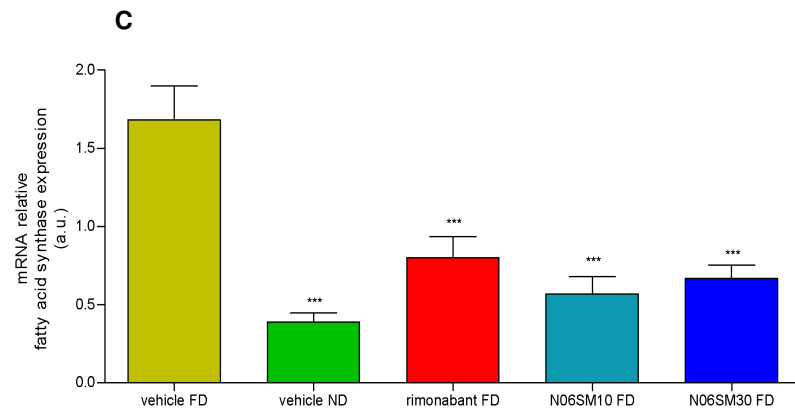
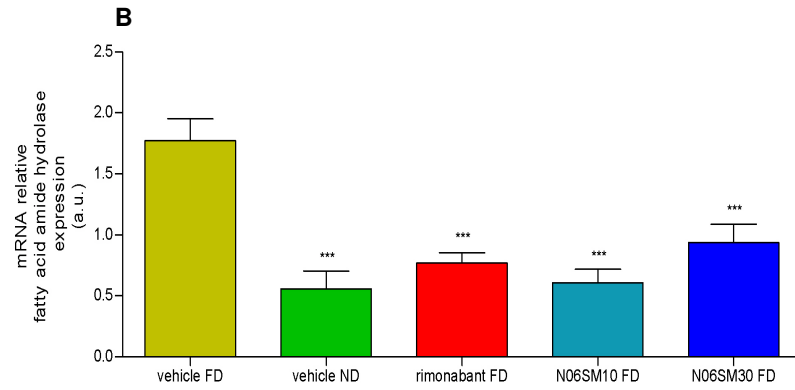
leptina. Le osservazioni sperimentali hanno evidenziato un incremento dell'mRNA dell'adiponectina in tutti gli animali che ricevono NESS06SM o rimonabant, e nei topi-DIO alimentati con una dieta normo-calorica rispetto al gruppo di controllo VH FD (Figura 13E) ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 11.2, p < 0.0001$ ). Al contrario l'mRNA della leptina subisce una significativa diminuzione nei topi-DIO esposti ai CB1-bloccanti e nei VH ND (Figura 13F) ( $F_{\text{treatment}}(4, 50) = 12.9, p < 0.0001$ ).

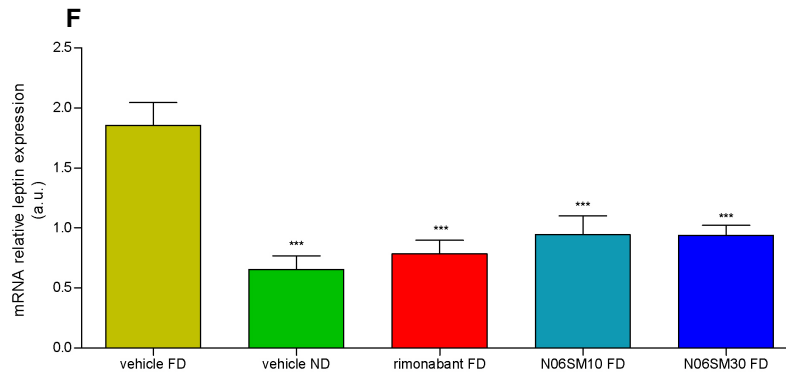




**Figura 12.** Espressione genica di marcatori metabolici nel fegato. Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), piruvato chinasi (B), acido grasso sintasi (C), glucochinasi (D), e proliferazione dei perossisomi-activated receptor- $\alpha$  (E) nel fegato di topi DIO dopo trattamento con rimonabant (10 mg/kg), e NESS06SM (10 mg/kg e 30 mg/kg). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM, \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs VH FD; ###  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  vs VH ND; §§§  $p < 0.001$ , §§  $p < 0.01$ , §  $p < 0.05$  vs rimonabant.





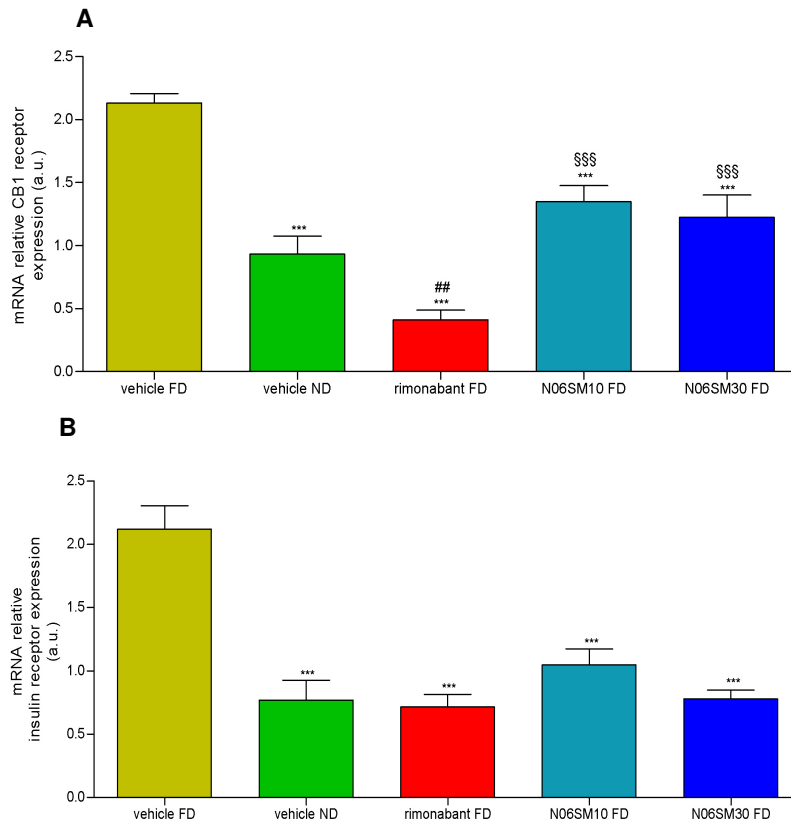


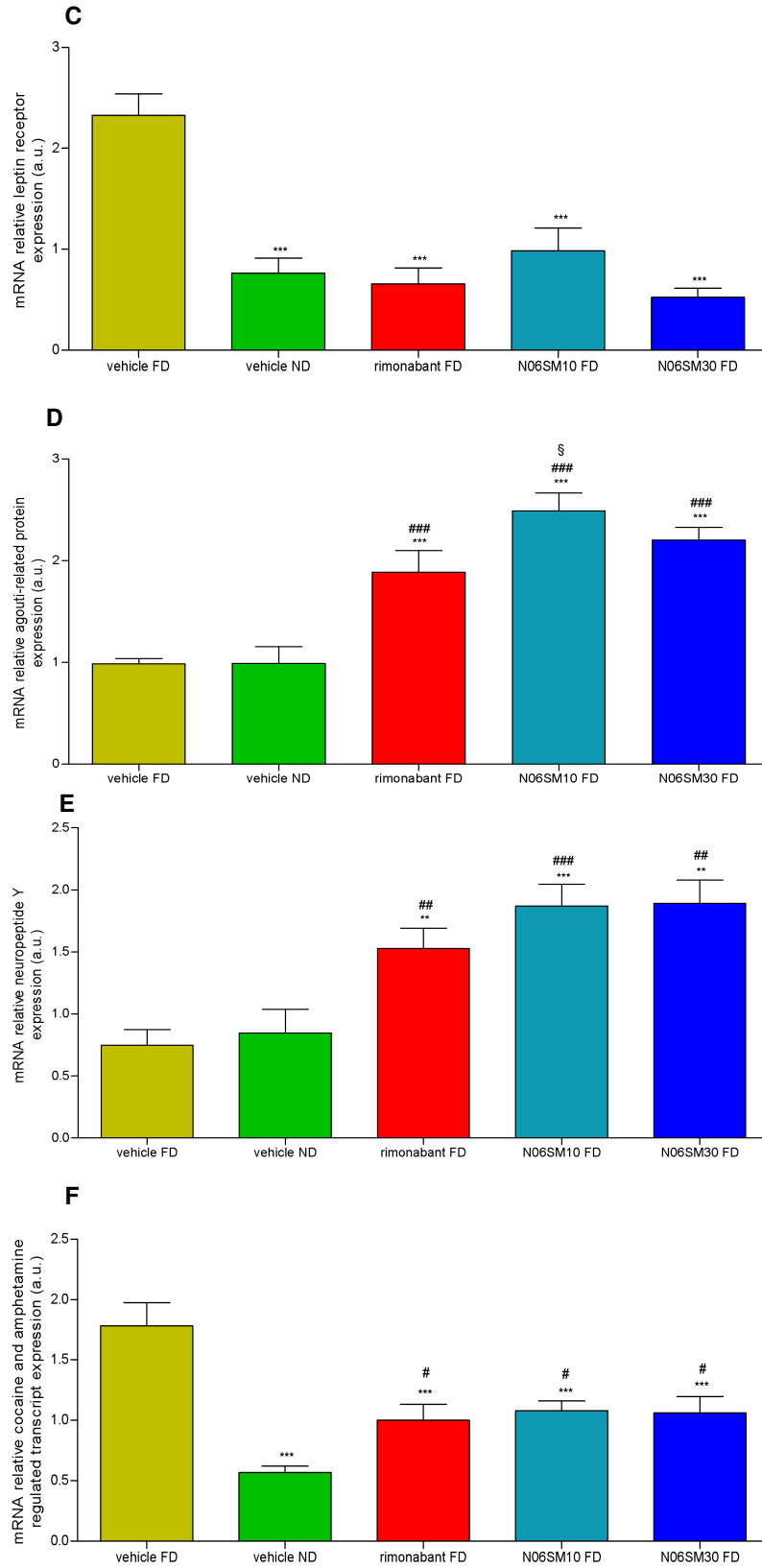
**Figura 13.** Espressione genica di markers molecolari nel tessuto adiposo bianco. Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), dell'idrolasi dell'amide dell'acido grasso (B), sintasi degli acidi grassi (C), peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (D), adiponectina (E) e leptina (F) nel tessuto adiposo di topi-DIO trattati per 31 giorni con rimonabant (10 mg/kg) and NESS06SM (10 mg/kg and 30 mg/kg). I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs VH FD.

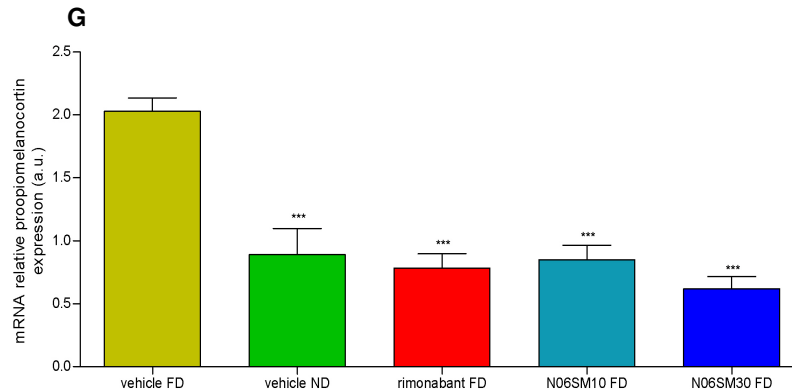
#### 4.6 Espressione genica nell'ipotalamo

Come discusso nell'introduzione, i circuiti fame/sazietà passano per l'ipotalamo, infatti questa regione anatomica del SNC è il crocevia dei "messaggeri" provenienti dai distretti periferici quali stomaco, intestino e soprattutto tessuto adiposo. Inoltre l'ipotalamo può considerarsi un distretto del sistema endocannabinoide in quanto ricco di recettori CB1 coinvolti nelle funzioni fisiologiche ipotalamiche. I dati sulla permeabilità teorica, simulata col software e i dati sperimentali sulla termoregolazione hanno evidenziato la scarsa permeabilità del NESS06SM rispetto al rimonabant. A conferma di ciò, come mostrato in Figura 14, il rimonabant si comporta da agonista inverso generando una forte e significativa *down-regulation* del recettore CB1 rispetto a tutti gli altri gruppi sperimentali, al contrario del NESS06SM che non induce una risposta da antagonista ( $F_{\text{treatment}}(4, 51) = 24.7$ ,  $p < 0.0001$ ). Per quanto riguarda i recettori dell'insulina ( $F_{\text{treatment}}(4, 44) = 19.5$ ,  $p < 0.0001$ ) e i recettori della leptina ( $F_{\text{treatment}}(4, 44) = 13.4$ ,  $p < 0.0001$ ) si è osservato una riduzione

dell'espressione dell'mRNA nei gruppi sperimentali VH ND, rimonabant FD, N06SM10 FD e N06SM30 FD rispetto al gruppo di controllo VH FD (Figura 14A, B e C). Inoltre, sono stati misurati anche i livelli d'espressione dei diversi neurotrasmettitori ipotalamici oressigenici e anoressigenici. I dati raccolti hanno evidenziato una regolazione positiva da parte dei CB1 bloccanti nei confronti dei peptidi oressigenici come NPY ( $F_{\text{treatment}}(4, 46) = 9.3, p < 0.0001$ ) e AGRP ( $F_{\text{treatment}}(4, 44) = 19.7, p < 0.0001$ ) rispetto al VH FD (Figura 14D ed E), da cui si discosta anche il gruppo VH ND. Al contrario, il trattamento con rimonabant e NESS06SM genera una *down-regulation* dell'mRNA dei peptidi anoressigenici come POMC ( $F_{\text{treatment}}(4, 44) = 17.8, p < 0.0001$ ) e CART ( $F_{\text{treatment}}(4, 44) = 11.4, p < 0.0001$ ) rispetto al gruppo VH FD (Figura 14F e G).





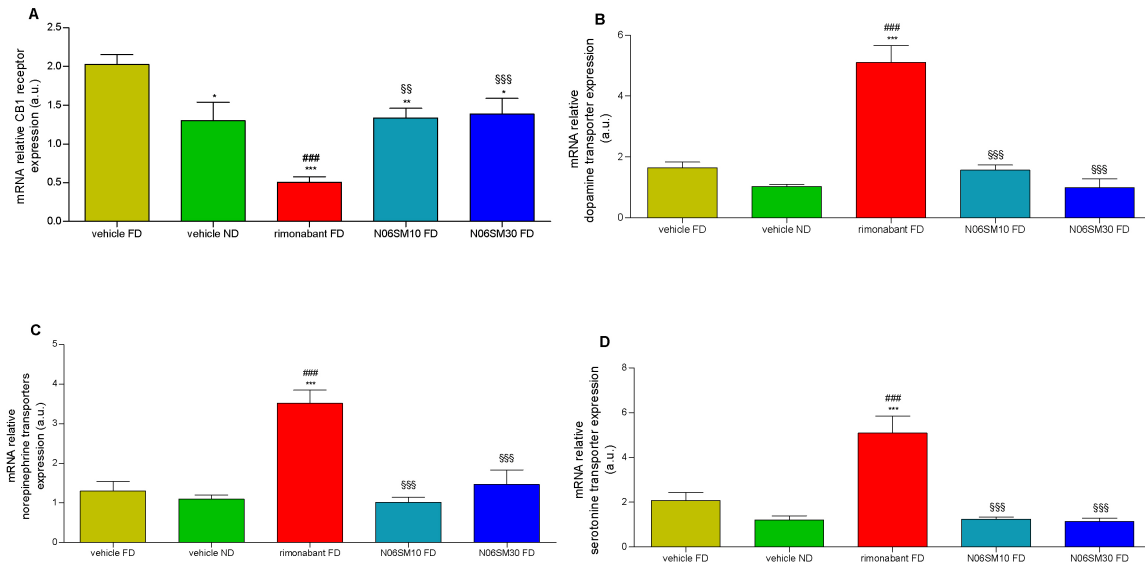


**Figura 14.** Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), del recettore insulinico (B), del recettore della leptina (C), dei peptidi oressigeni come il neuropeptide Y (D) e la proteina agouti-related (E), e dei peptidi anoressigeni come il trascritto regolato da cocaina e anfetamina (F) e la prooppiomelanocortina (G) nell'ipotalamo di topi-DIO trattati per 31 giorni con rimonabant (10 mg/kg) and NESS06SM (10 mg/kg and 30 mg/kg). I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M, \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs VH FD; ####  $p < 0.001$ , ###  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  vs VH ND; §§§  $p < 0.001$ , §§  $p < 0.01$ , §  $p < 0.05$  vs rimonabant FD.

#### 4.7 Espressione genica dei trasportatori monoaminergici

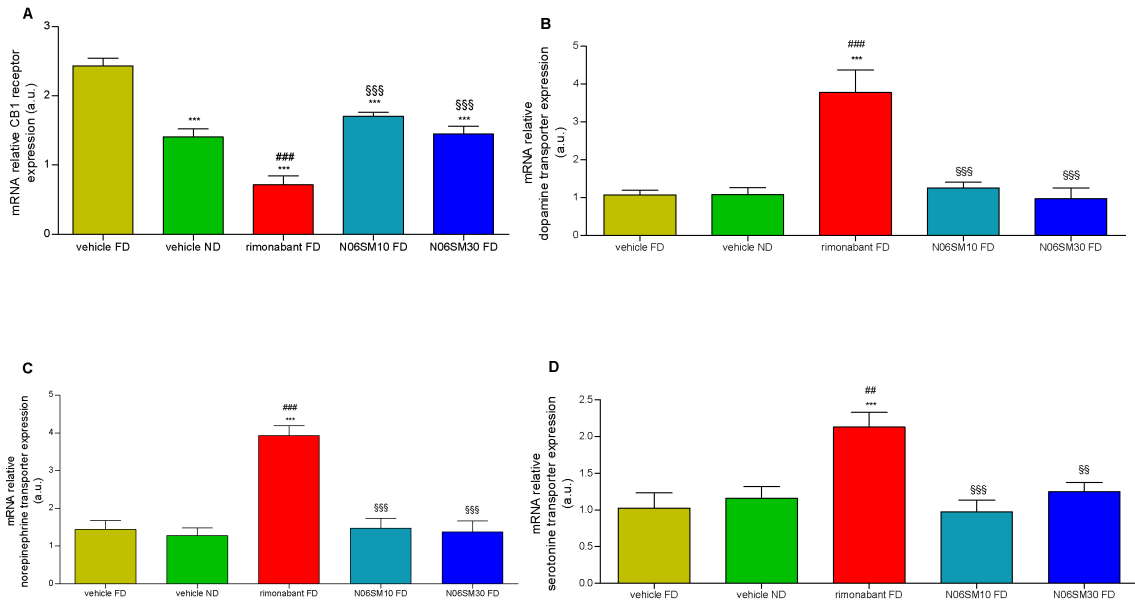
Al fine di determinare alcune delle interazioni tra sistema monoaminergico e quello endocannabinoide nel SNC, e stata misurata l'espressione dell'mRNA del recettore CB1, del trasportatore della dopamina (DAT), della noradrenalina (NET) e della serotonina (SERT). L'mRNA dei trasportatori monoaminergici (MATs) e del recettore CB1 sono stati rilevati nel nucleus accumbens (ACC, Figura 15), nell'amigdala (AMY, Figura 16) e nella corteccia prefrontale (PCX, Figura 17). Anche in questi distretti si conferma l'azione CB1 antagonista (agonista inverso) del rimonabant, con una forte *down-regulation* del recettore CB1 in tutte queste aree mesolimbiche. Questa regolazione così fortemente negativa non la si osserva nei gruppi trattati col NESS06SM e neanche nel VH ND, nonostante si evidenziano differenze statisticamente significative col VH FD. Ma l'effetto più rilevante lo si osserva nell'espressione dei trasportatori monoaminergici. Infatti, mentre il NESS06SM (per entrambe i dosaggi) non mostra differenze significative rispetto ai due

gruppi che non ricevono il farmaco (VH FD e VH ND), al contrario il rimonabant ha generato una considerevole *up-regulation* di tutti i MATs in tutti i distretti mesolimbici.

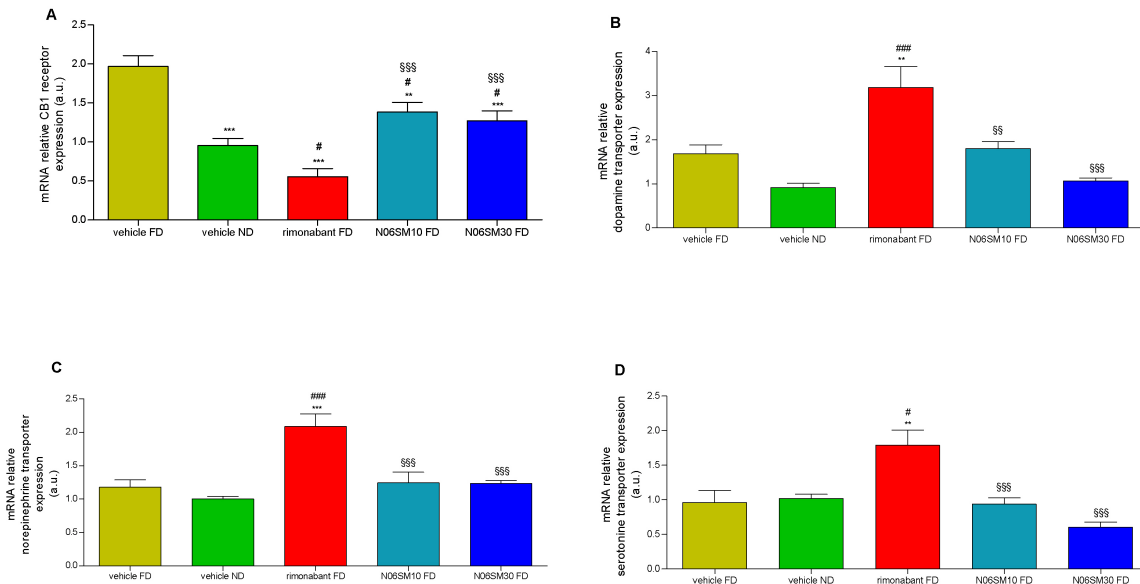


**Figura 15.** Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), del DAT (B), del NET (C), e del SERT (D) nel nucleus accumbens di topi-DIO trattati per 31 giorni con rimonabant (10 mg/kg) and NESS06SM (10 mg/kg and 30 mg/kg). Recettore CB1 ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 7.1, p < 0.0001$ ), DAT ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 30.2, p < 0.0001$ ), NET ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 17.2, p < 0.0001$ ), SERT ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 16.8, p < 0.0001$ ). I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M., \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs VH FD; ###  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  vs VH ND; \$\$\$  $p < 0.001$ , \$\$  $p < 0.01$ , \$  $p < 0.05$  vs rimonabant FD.





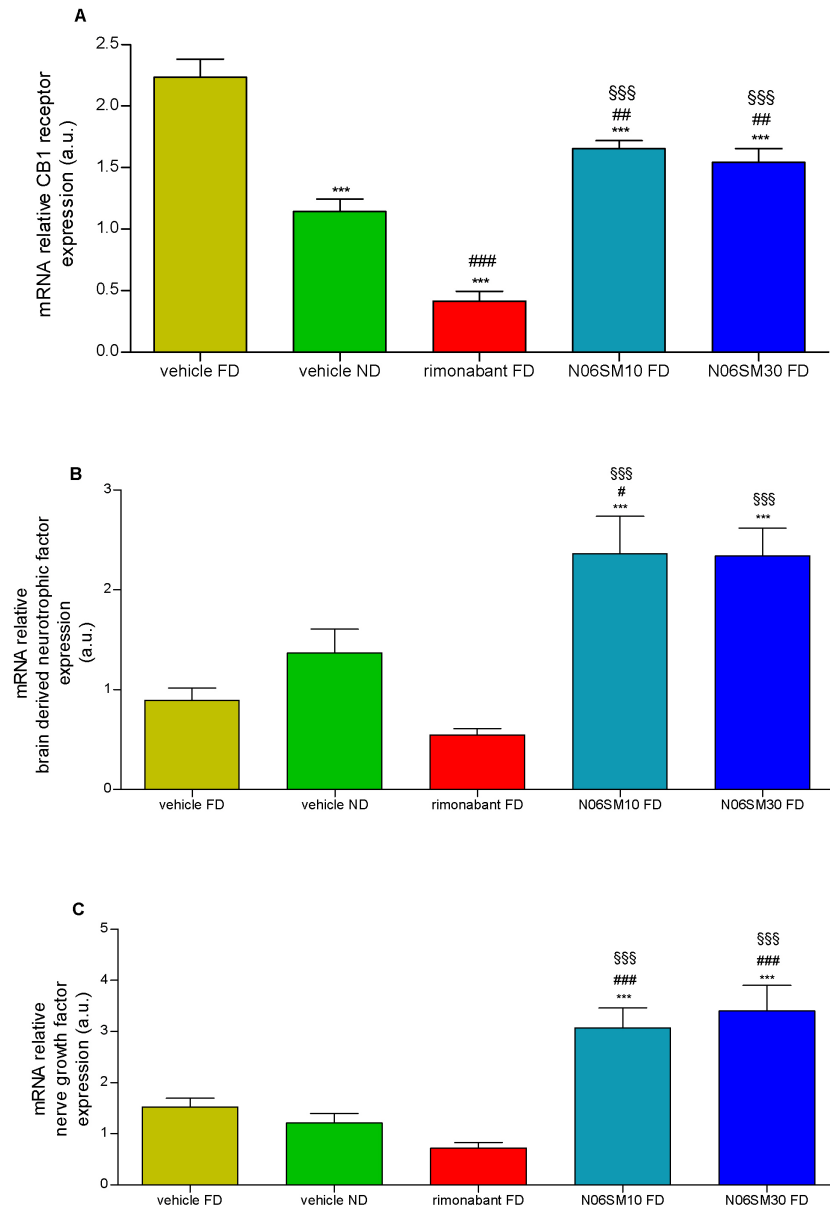
**Figura 16.** Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), del DAT (B), del NET (C), e del SERT (D) nel amigdala di topi-DIO trattati per 31 giorni con rimonabant (10 mg/kg) and NESS06SM (10 mg/kg and 30 mg/kg). Recettore CB1 ( $F_{\text{treatment}}(4, 51) = 7.91, p < 0.0001$ ), DAT ( $F_{\text{treatment}}(4, 50) = 13.1, p < 0.0001$ ), NET ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 21.9, p < 0.0001$ ), SERT ( $F_{\text{treatment}}(4, 52) = 7.9, p < 0.0001$ ). I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 vs VH FD; ####p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 vs VH ND; §§§p<0.001, §§p<0.01, §p<0.05 vs rimonabant FD.



**Figura 17.** Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), del DAT (B), del NET (C), e del SERT (D) nella corteccia prefrontale di topi-DIO trattati per 31 giorni con rimonabant (10 mg/kg) and NESS06SM (10 mg/kg and 30 mg/kg). recettore CB1 ( $F_{\text{treatment}}(4, 58) = 7.4, p < 0.0001$ ), DAT ( $F_{\text{treatment}}(4, 58) = 11.1, p < 0.0001$ ), NET ( $F_{\text{treatment}}(4, 56) = 10.2, p < 0.0001$ ), SERT ( $F_{\text{treatment}}(4, 56) = 9.1, p < 0.0001$ ). I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs VH FD; ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  vs VH ND; §§§ $p < 0.001$ , §§ $p < 0.01$ , § $p < 0.05$  vs rimonabant FD.

#### **4.8 NESS06SM: espressione genica nell'ippocampo**

Il passo successivo è stato quello di definire l'espressione di fattori neurotrofici coinvolti nei disturbi dell'umore a livello dell'ippocampo. Come visto in precedenza anche in quest'area centrale la dieta iper-lipidica genera una iper attivazione del sistema endocannabinoide tale da incrementare l'espressione del recettore CB1 come osservato in Figura 18A. Questo effetto viene marcatamente neutralizzato con la somministrazione del rimonabant. La dieta normocalorica e il NESS06SM non antagonizzano in maniera marcata come il rimonabant ma mostrano, come visto per le altre aree del SNC, una regolazione più bassa rispetto al VH FD ( $F_{\text{treatment}}(4, 51) = 12,9, p < 0,0001$ ). Ma il dato più sorprendente è che la somministrazione cronica di entrambe le dosi di NESS06SM hanno determinato un considerevole aumento dell'mRNA del BDNF (Figura 18B) e del NGF (Figura 18C) nell'ippocampo rispetto ai gruppi VH FD e VH ND (BDNF:  $F_{\text{treatment}}(4, 58) = 11.6, p < 0.0001$  e NGF:  $F_{\text{treatment}}(4, 58) = 14.6, p < 0.0001$ ). Al contrario il rimonabant nonostante non abbia mostrato alcun effetto statisticamente rilevante sull'espressione delle due neurotrofine, mantiene comunque un trend negativo.



**Figura 18.** Espressione dell'mRNA del recettore CB1 (A), del BDNF (B) e del NGF (C) nell'ippocampo di topi-DIO trattati per 31 giorni con rimonabant (10 mg/kg) and NESS06SM (10 mg/kg and 30 mg/kg). I valori sono espressi come media  $\pm$  S.E.M, \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05 vs VH FD; ### $p$ <0.001, ## $p$ <0.01, # $p$ <0.05 vs VH ND; §§§ $p$ <0.001, §§ $p$ <0.01, § $p$ <0.05 vs rimonabant FD.

## 5. DISCUSSIONE

Nel presente studio è stato dimostrato che il trattamento cronico di topi obesi (C57BL/6N topi DIO) con il nuovo antagonista neutro del recettore CB1, NESS06SM, caratterizzato da una scarsa permeabilità alla barriera ematoencefalica, induce una sensibile riduzione del peso corporeo e dell'assunzione di cibo, un miglioramento dei fattori di rischio cardiovascolari nel sangue, e il ripristino dei pathway metabolici tra il SNC e i distretti periferici.

I dati sull'affinità recettoriale dei NESS06SM, precedentemente riportati [77], hanno mostrato un'alta affinità CB1 ( $K_i = 10.25$  nM), e una notevole selettività per questi recettori rispetto ai recettori CB2 ( $K_i$  CB2 > 5000 nM). Inoltre l'antagonismo neutro del NESS06SM è stato dimostrato sia dai saggi ( $^{35}\text{S}$ ) GTP $\gamma$ S; dove non ha evidenziato alcun effetto significativo sulla GTP una volta legato al recettore; sia dall'espressione proteica di Erk  $\frac{1}{2}$ , proteina espressa con l'attivazione del recettore CB1. Il NESS06SM mostra un comportamento da antagonista solo quando è presente un agonista. Infatti, come viene mostrato dai risultati di western blot sull'attivazione recettoriale, l'azione dall'agonista di riferimento, l'ACEA, che porta all'espressione di Erk  $\frac{1}{2}$  viene bloccata dal NESS06SM. Quindi i dati sulla GTP $\gamma$ S e sul western blot evidenziano in primo luogo l'assenza di attività intrinseca da parte del NESS06SM, e successivamente, in particolare col western blot, evidenzia il suo antagonismo al recettore CB1. Quest'ultima caratteristica è stata osservata anche nella risposta del vaso deferente alla contrazione generata dalla corrente elettrica. Il NESS06SM, infatti, è capace di bloccare l'azione inibente sulla contrazione del vaso deferente generata dall'agonista WIN 55,512-2 sul recettore CB1 ma non presenta attività intrinseca come il rimonabant. Infatti, come riportato in altri lavori [78], l'agonista inverso, genera degli incrementi significativi nella ampiezza del contrazioni evocate elettricamente sul vaso deferente di topo.

La strategia nella progettazione di una nuova molecola ad attività antiobesità sul sistema endocannabinoide non può prescindere dalle problematiche che il rimonabant presentava a livello

del SNC [50]. E' noto infatti che gli effetti collaterali del rimonabant sul SNC, per le quali fu ritirato dal mercato, sono dipesi dalla sua capacità di superare la barriera emato-encefalica (BBB) generando delle alterazioni nella neurotrasmissione centrale [51]. Il NESS06SM non attraversa la BBB, ciò è stato dimostrato in primo luogo dai risultati sull'incapacità di bloccare l'innalzamento della temperatura corporea dopo trattamento con WIN 55,212-2 al contrario del rimonabant, e in secondo luogo dai modelli di simulazione chimico-informatico. Il NESS06SM è infatti caratterizzato da un basso valore di cLogPOW e valori superiori di tPSA rispetto al rimonabant. Inoltre, il NESS06SM ha evidenziato valori di BB significativamente inferiori rispetto ad altri composti di riferimento quali il rimonabant e il NESS0327. Però nonostante queste caratteristiche, è importante notare che non può essere totalmente escluso il passaggio della BBB di una infinitesima quantità di NESS06SM. Ulteriori studi sono attualmente in corso per determinare i parametri farmacocinetici del NESS06SM con lo scopo di quantificare direttamente l'effettiva concentrazione del composto nel cervello e in altri organi e tessuti dopo somministrazione orale.

Il passaggio ai test *in vivo* devono avvenire solo dopo aver accertato l'inesistente tossicità del composto *in vitro*. I dati raccolti sulle cellule di feocromocitoma di topo non hanno evidenziato alcuna tossicità del composto di nuova sintesi, e questo ha permesso l'avanzamento nella caratterizzazione farmacologica del NESS06SM.

Per gli studi sul comportamento alimentare sono stati scelti i topi C57BL/6N DIO in quanto questo modello alimentato con diete iper caloriche (soprattutto iper-lipidiche) sviluppa obesità, insieme ad altri disturbi come la resistenza all'insulina, il diabete, l'ipercolesterolemia, steatosi e viene universalmente considerato il modello migliore per lo studio della fisiopatologia dell'obesità e delle patologie concomitanti [79,80]. Questo modello viene scelto a discapito sia dei modelli preclinici dell'obesità basati sui topi con una mutazione monogenica (C57BL/6J db/db o C57BL/6J ob/ob) sia rispetto ai ratti [79] per il loro elevato costo gestionale.

I nostri dati hanno rivelato che i topi DIO alimentati con una dieta grassa (D12492) e trattati cronicamente con rimonabant o NESS06SM mostrano una consistente perdita di peso e una diminuzione dell'apporto calorico per tutta la durata del trattamento. Questi effetti erano simili a quelli determinati dal cambio di dieta, da una iper calorica a una normo-calorica. Il cambiamento nell'ambiente sperimentale portano sempre a un'alterazione nei cicli di nutrimento e abbeveraggio [79]. Il nostro modello di animale obeso è stato alimentato con una dieta altamente palatabile subito dopo l'allattamento, a partire dalla 4<sup>a</sup> - 6<sup>a</sup> settimana di vita, fino alla 10<sup>a</sup> settimana dove avviene il cambio di dieta. Questo passaggio genera nei primi 3 - 4 giorni un effetto ipofagico, dettato proprio dalla più bassa appetibilità del cibo normo- calorico. Questo dato è osservato in diversi lavori pubblicati [70] e inoltre avvalorata la difficoltà della specie umana a seguire un regime alimentare dietetico, e quindi la necessità di avere un incentivo farmacologico.

Come è stato visto il NESS06SM ha evidenziato la capacità di ridurre il peso inducendo una diminuzione del consumo di cibo, tuttavia, l'azione di questo composto sembra essere correlato ad una azione metabolica mirata a stimolare il consumo energetico. La forza del NESS06SM di indurre la riduzione del peso corporeo, così come una maggiore stimolazione del dispendio energetico è in comune con altri CB1 antagonisti o agonisti inversi [70,81-84]. Infatti in tutti i gruppi sperimentali che ricevono un trattamento farmacologico si osserva una variazione del peso corporeo, e una conseguente variazione del BMI e massa grassa totale. E' interessante osservare come il BMI si riduca del 40% alla fine dei 31 giorni in tutti gli animali che ricevono CB1 bloccanti o passano alla dieta normale, rispetto al gruppo di controllo VH FD. Parallelamente i nostri dati confermano una marcata riduzione del tessuto adiposo bianco nell'ordine del 80% e un incremento del tessuto adiposo bruno del 40% rispetto al VH FD in VH ND, rimonabant 10, N06SM10 e topi N06SM30. Questi dati sono in accordo con i numerosi studi che hanno stabilito come una dieta iper-calorica generi un elevato accumulo di grasso viscerale, dislipidemia, insulino resistenza [85-87] e che

l'omeostasi può venir ripristinata con la somministrazione di CB1 antagonisti [88,89]. Inoltre, in accordo con i risultati di recenti lavori [37,90,91], si è dimostrato che il blocco dei recettori CB1 e il passaggio alla dieta normo-calorica hanno portato alla normalizzazione dei parametri ematici di glucosio, trigliceridi, colesterolo e transaminasi.

Come detto in precedenza, le nuove terapie contro l'obesità che hanno come obiettivo il sistema endocannabinoide si stanno concentrando su bersagli periferici [54], infatti, una terapia ideale anti-obesità decrementa il peso corporeo modulando le vie enzimatiche nel fegato e nel grasso viscerale [92-94]. La letteratura scientifica da diversi anni ha evidenziato l'*up-regulation* del sistema endocannabinoide in modelli umani e animali con severa obesità [95] contrastata da trattamenti farmacologici con CB1 bloccanti [36]. Inoltre, in uno studio precedentemente pubblicato è stato dimostrato che il trattamento con CB1 antagonisti *down-regola* l'espressione dell'acido grasso sintasi nel tessuto adiposo e, al contrario, *up-regola* mRNA di questo enzima nel fegato [70]. Sulla base di tutte queste valutazioni, in questo studio è stata analizzata l'espressione genica dei pathway enzimatici coinvolti nel metabolismo dei cannabinoidi del fegato e del tessuto adiposo. E' stata confermata l'azione periferica degli antagonisti CB1 sul *up-regulation* nel fegato dell'mRNA degli enzimi catabolici come la piruvato chinasi, l'acido grasso sintasi e la glucochinasi rispetto a VH FD. Questa azione è stata particolarmente evidente nei topi-DIO trattati con NESS06SM. Contemporaneamente, in accordo con la letteratura scientifica [37,89], abbiamo osservato una *down-regulation* dei FAS e FAAH mRNA nel tessuto adiposo di tutti i seguenti gruppi sperimentali: VH ND, N06SM10 FD, N06SM30 FD, e in quelli che ricevono rimonabant. Queste osservazioni hanno evidenziato come il passaggio ad una dieta normocalorica e il trattamento con i CB1 antagonisti moduli la lipogenesi inibendo i processi di sintesi degli acidi grassi e l'espressione dell'mRNA dell'enzima catabolico delle ammidi di acidi grassi [38,82]. In particolare è stato riportato che un eccesso di grasso nella dieta induce una riduzione nell'espressione di enzimi

lipogenici, come il FAS, nel fegato di topi DIO [39], inibizione che viene bloccata grazie al trattamento con gli antagonisti ai cannabinoidi e dalla dieta normale, che al contrario generano un incremento dell' RNA di enzimi lipogenici. A tal proposito si ritiene che quest'attivazione degli enzimi lipogenici sia dovuto al ripristino del tessuto adiposo appena perso con il trattamento. Al contrario, come dimostrato da Boizard M et al [40], si è osservato un incremento dell'attività del FAS nel tessuto adiposo di topi DIO alimentati con dieta grassa generata dall'aumento del peso corporeo. Questo effetto viene bloccato dai CB1R agonisti inversi [41] che portano ad una perdita di peso corporeo, dettata dal blocco della nuova sintesi di tessuto adiposo e da una diminuita assunzione di cibo. Tutti questi concetti sul coinvolgimento del sistema endocannabinoide sui pathway metabolici periferici sono confermati dai risultati ottenuti sulla *down-regulation* dell'mRNA del recettore CB1 nel fegato e nel tessuto adiposo di VH ND nonché negli animali che ricevono rimonabant e NESS06SM rispetto VH FD che invece presenta un'iperattivazione. Un'altra azione degli antagonisti al recettore CB1 è stata quella di regolare l'espressione delle proteine nucleari con una *up-regulation* delle PPAR- $\alpha$  nel fegato e una *down-regulation* delle PPAR- $\gamma$  nel tessuto adiposo. Questo dato si ricollega all'ormai nota azione delle PPARs sul metabolismo cellulare [42,43], inducendo a pensare che l'azione dei CB1 antagonisti, ma non il passaggio alla dieta normale, attiva il metabolismo del fegato e la lipogenesi seguendo i pathways delle PPARs.

E' stato dimostrato che il tessuto adiposo ha una notevole influenza sulla omeostasi metabolica sistemica. In particolare agisce come organo endocrino capace di secernere diversi peptidi/ormoni [75]. Tra i peptidi/ormoni legati alle vie metaboliche, l'adiponectina e la leptina sono i segnali più significativi espressi dal tessuto grasso. Entrambi sono in grado di interagire con il centro ipotalamico della fame e della sazietà [24,25,96]. Infatti, la leptina è un segnale di sazietà e il livello di leptina è proporzionale sia al livello di insulina nel sangue che alla quantità totale di tessuto adiposo nel corpo [25]. Questo dato è ulteriormente confermato dai risultati sopraesposti relativi al



peso corporeo e all'espressione di leptina mRNA. In generale è stata osservata una diminuzione dell'espressione genica della leptina in tutti i topi DIO caratterizzati da una notevole perdita di peso (VH ND, rimonabant FD, N06SM10 FD e N06SM30 FD). Parallelamente i risultati sull'mRNA dell'adiponectina hanno mostrato un *up-regulation* nei topi DIO passati a una dieta standard e in quelli che hanno ricevuto rimonabant e NESS06SM rispetto ai topi VH FD. Questi dati sono in linea con tutti quegli studi precedenti che hanno evidenziato l'esistenza di una relazione inversa tra il peso corporeo e i livelli circolanti di adiponectina. Infatti l'adiponectina oltre a mostrare effetti cardiovascolari e insulino-sensibilizzanti [97], molti lavori scientifici sottolineano come i livelli plasmatici sono più bassi negli esseri umani e nei topi obesi, e aumentano nei soggetti normopeso [26]. Quindi si ritiene che il blocco periferico del recettore CB1 regoli anche il signaling della leptina e dell'adiponectina e che quest'azione sia coinvolta in molti processi metabolici come l'omeostasi del glucosio e dell'insulina, la normalizzazione dei parametri ematici, il dispendio energetico e la riduzione del tessuto adiposo.

L'interesse della ricerca farmaceutica in questi ultimi anni volto all'azione periferica degli antagonisti / agonisti inversi del recettore CB1 si basa sulla forte connessione tra i circuiti metabolici periferici di leptina/insulina e il cervello. In particolare, la letteratura scientifica ha indicato come i livelli di leptina e insulina siano elevati nei soggetti obesi [32], e che questa condizione generi un *up-regulation* dei rispettivi recettori nell'ipotalamo [33]. Inoltre, la condizione patofisiologica dell'obesità, registra spesso un'iperattivazione del sistema endocannabinoide, registrato da una maggiore espressione di recettori CB1 [34]. Anche i nostri dati confermano sui topi DIO di controllo, VH FD, un aumento dell'espressione dei recettori CB1, INS-R e LEP-R. Al contrario gli animali trattati con NESS06SM o rimonabant, o passati alla dieta normocalorica, hanno mostrato un decremento dell'espressione dell'mRNA dei recettori della leptina e dell'insulina nell'ipotalamo. Per quanto riguarda il recettore CB1 si osservano due risposte differenti

nei topi DIO che ricevono rimonabant e quelli che ricevono NESS06SM. Il rimonabant attraversa la BBB ed essendo un agonista inverso ha modo di inibire l'espressione del recettore CB1. Il NESS06SM non attraversando la BBB non ha la possibilità di antagonizzare l'espressione del recettore CB1 per entrambe le dosi esaminate. Come dimostrato in un precedente lavoro [70] la sovra espressione dei recettori della leptina/insulina nell'ipotalamo è accompagnata da un'alterazione dell'espressione dei peptidi ipotalamici oressigenici / anoressigenici nei topi DIO [70,81]. Infatti, è noto che esistono due popolazioni di neuroni ipotalamici che rispondono alla stimolazione leptinica: POMC/CART con azione anoressigenica, che vengono attivati, e AGRP/NPY con azione oressigenica, che invece ne sono inibiti. Dai risultati raccolti emerge che i topi DIO trattati col nuovo antagonista CB1 neutro così come nel caso di quelli con rimonabant o VH ND, evidenziano un *up-regulation* dei peptidi ipotalamici oressigenici e un *down-regulation* di quelli anoressigenici. Questo intero impianto metabolico ipotalamico è il fulcro centrale della regolazione fame/sazietà, lungo queste delicate vie passano i messaggi che ci spingono a mangiare, superando le fisiologiche necessità. Infatti quando il sistema "funziona" intervengono subito i segnali di sazietà che, come pocanzi discusso, son legati alla quantità di grasso di deposito che ogni individuo possiede, fermando l'introito di cibo [81]. Quando il sistema "non funziona" il segnale di blocco non viene percepito più dall'organismo e si continua a mangiare, sviluppando quella che è chiamata leptino-resistenza accompagna spesso dall'insulino-resistenza [81]. La terapia per combattere l'obesità e la sindrome metabolica si è basata a partire dal 2005 sul rimonabant, poi tra gli anni 2007 – 2008 l'Acomplia (nome commerciale) viene ritirato dal mercato farmaceutico europeo e statunitense per i pesanti effetti collaterali segnalati a carico del SNC [49,50]. Infatti, contemporaneamente agli effetti positivi sulla riduzione del peso corporeo, sui fattori di rischio cardiovascolare e sul diabete nei soggetti obesi si sono evidenziati alterazioni dell'umore, depressione con pensieri suicidari [98]. Questi effetti collaterali spinsero le autorità regolatorie a

bloccare le autorizzazioni alla vendita del farmaco e le aziende farmaceutiche a fermare tutti i trials clinici sui composti analoghi al rimonabant come il taranabant. Però la ricerca scientifica sulla regolazione dei circuiti fame/sazietà basati sul sistema endocannabinoide, al contrario, non si è fermata e in questi ultimi anni, si è concentrata sugli antagonisti CB1 neutri o agli antagonisti CB1 solo periferici [54,55,99,100]. Questi composti non attraversando la BBB non dovrebbero avere quegli effetti negativi sui sistemi mesolimbici che regolano l'umore [101]. Infatti, le alterazioni a carico delle trasmissioni monoaminergiche, che coinvolgono i neurotrasmettitori serotonina, dopamina e noradrenalina, e i diversi trasportatori, SERT, DAT e NET (MATs), sono alla base dei disturbi dell'umore [102]. In particolare i MATs svolgono un ruolo molto importante in quanto "liberano" gli spazi sinaptici dalle monoamine, regolando processi quali piacere e gratificazione [101]. A questi mediatori si aggiungono, come riportato dalla letteratura scientifica sui disturbi dell'umore di questi ultimi anni, le neurotrofine, BDNF e NGF, la cui alterata espressione modificando i processi di neurogenesi ippocampali, porterebbe ad un aumento della depressione [103]. Detto ciò, la terapia di molti antidepressivi si basa sul blocco dell'attività dei MATs, così da permettere alle monoamine di stimolare l'attività mesolimbica [102] e incrementare l'espressione delle neurotrofine [104]. Al fine di valutare il ruolo del NESS06SM sui meccanismi patologici di depressione e alterazione dell'umore, sono stati misurati i livelli d'espressione dei trasportatori monoaminergici e delle neurotrofine in alcune aree mesolimbiche come la corteccia prefrontale (PCX), l'amigdala (AMY), il nucleo accumbens (ACC) e l'ippocampo (HIPPO). Inoltre per definire il coinvolgimento del sistema endocannabinoide è stata valutata in queste aree l'espressione dell'mRNA del recettore CB1. I dati raccolti hanno evidenziato come il NESS06SM conferma la sua scarsa influenza sull'espressione del recettore CB1 nell'area mesolimbica al contrario del rimonabant che invece mostra un *down-regulation* dei recettori CB1. Questo dato conferma ulteriormente l'impossibilità del NESS06SM di attraversare la BBB al contrario del rimonabant. Al

contrario, l'elevata permeabilità del rimonabant potrebbe spiegare quegli effetti centrali negativi sulla trasmissione monoaminergica mediata dal recettore CB1[105-107]. Infatti, molti autori hanno riportato come i recettori CB1 siano presenti in aree del cervello, tra cui amigdala, corteccia prefrontale, sistema limbico, striato e talamo, dove son coinvolti nei processi di depressione e ansia [108]. Diversi autori, inoltre, hanno riportato come i livelli del CB1R aumentino nella corteccia prefrontale di roditori esposti a stress imprevedibile cronico [109] e come il recettore CB1 moduli le risposte di ansia nella amigdala prevenendo le alterazioni dell'umore in risposta allo stress [110,111]. I dati sopra esposti confermano il coinvolgimento dei CB1 antagonisti/agonisti inversi nella modulazione delle emozioni, dello stress e in generale nei comportamenti alla base dei disturbi psichiatrici umani. Tuttavia, il profilo del NESS06SM risulta essere migliore rispetto al rimonabant per quanto riguarda l'espressione delle MATs e delle neurotrofine. Infatti, i topi DIO trattati con rimonabant mostrano una forte *up-regolazione* dell'mRNA di SERT, DAT e NET e una diminuzione dell'mRNA del BDNF e del NGF nell'ippocampo. Tutti questi dati sono confermati dalla letteratura sugli effetti collaterali del rimonabant [112]. Viceversa il NESS06SM induce un incremento delle neurotrofine ippocampali e non altera l'espressione delle MATs conservando i livelli d'espressione dei gruppi sperimentali non trattati col farmaco. Queste caratteristiche peculiari del NESS06SM possono essere considerate uno dei goal di questa terapia contro l'obesità con un effetto positivo su ansia, depressione e l'umore in generale.

## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, come visto dai dati sperimentali discussi sopra, gli effetti sulla perdita di peso, l'azione sul metabolismo epatico e lipidico, ma soprattutto l'impossibilità di attraversare la BBB e la scarsa attività intrinseca rendono il NESS06SM un promettente composto nella cura dell'obesità. Inoltre, nonostante la capacità terapeutica del NESS06SM nel combattere l'obesità si sovrapponga a

quella del rimonabant, il nuovo composto non altera la trasmissione mesolimbica e sembra migliorare l'espressione delle neurotrofine al contrario del rimonabant. Bisogna riconoscere però che questo nuovo composto non pretende di essere la cura definitiva all'obesità, che rimane ancora una patologia sistemica con una forte interazione con i geni regolatori del metabolismo. Inoltre, le persone fortemente obese, hanno un indice di recidiva molto elevato. Questo a dimostrazione che l'equilibrio fame/sazietà è veramente complesso e una sola via terapeutica non può essere sufficiente, sia che si tratti di prescrivere un regolare regime alimentare o una intensa attività fisica o un trattamento farmacologico. Risulta essere necessario integrare diverse strategie che però non possono prescindere da una terapia farmacologica che compartecipa al riassetto dell'equilibrio fame/sazietà. Il NESS06SM sembra possedere le caratteristiche di un potenziale farmaco moderno nella cura dell'obesità soprattutto perché il bersaglio terapeutico rimane la periferia del nostro organismo, come fegato e tessuto adiposo. Se queste peculiari caratteristiche saranno confermate anche in altri modelli preclinici e in quelli clinici più avanzati si sarà intrapresa la giusta direzione per la cura dell'obesità.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013; 93: 359-404.
- [2] Withrow D. e D. A. Alter, The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity, *Obesity Reviews*, 2011, 12, 2, pp. 131-141.
- [3] Tsai A. G., D. F. Williamson e H. A. Glick Direct medical cost of overweight and obesity in the USA: a quantitative systemic review, *Obesity Reviews* 2010, 12, 1, pp. 50-61.
- [4] Sassi F. Obesity and the economics of prevention. *Fit not fat*, OECD 2010.
- [5] G. Anceschi Monogrammi e figure La Casa Usher, Milano 1981
- [6] Cordain, Loren, Implications of Plio-pleistocene diets for modern humans in Peter S. Ungar (a cura di), *Evolution of the human diet: the known, the unknown and the unknowable*, 2007, pp. 264–5.
- [7] Jérôme Carcopino, *La vita quotidiana a Roma*, Universale Laterza, Bari 1971
- [8] Andrea Giardina, *L'uomo romano*, «Economica Laterza», 1993
- [9] Jeremy Rifkin, *Ecocidio: ascesa e caduta della cultura della carne*, trad. di Paolo Canton, Mondadori, Milano 2001
- [10] Thomas Oliver, m.b, *Post-mortem in a case of extreme obesity*, Physician to the newcastle-upon-tyne infirmary. 1877
- [11] Douthwaite A.H., *Obesity*, *British Medical Journal*, 1951
- [12] Salans LB, Wise JK. Metabolic studies of human obesity. *Med Clin North Am.* 1970 Nov;54(6):1533-42.
- [13] Dr. Staffan Lindeberg *Food and Western Disease: Health and Nutrition from an Evolutionary Perspective*, 2010, Chichester, U.K., Wiley-Blackwell
- [14] Robb Wolf, *La paleo dieta*, 2011, Venezia, Sonzogno

- [15] Spencer Wells, *Il seme di Pandora*, 2011, Editore Codice
- [16] WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
- [17] Dittmar M., Comparison of bipolar and tetrapolar impedance techniques for assessing fat mass, *Am J Hum Biol*, 16(5):593-7, 2004.
- [18] WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010, Chronic disease - prevention and control, epidemiology, mortality. World Health Organization 2010
- [19] Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2052-9
- [20] Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S138-43.
- [21] Boden WE, Pearson TA. Raising low levels of high-density lipoprotein cholesterol is an important target of therapy. *Am J Cardiol*. 2000 Mar 1;85(5):645-50
- [22] Batra A, Siegmund B. The role of visceral fat. *Dig Dis* 2012; 30: 70-4.
- [23] Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:305763.
- [24] Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301: E567-84.
- [25] Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, Arumugam TV. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 313-27.
- [26] Kishida K, Kim KK, Funahashi T, Matsuzawa Y, Kang HC, Shimomura I. Relationships between circulating adiponectin levels and fat distribution in obese subjects. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18: 592-5.

- [27]Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2563-68.
- [28]Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 461-70.
- [29]Maccarrone M, Gasperi V, Catani MV, Diep TA, Dainese E, Hansen HS et al. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu Rev Nutr* 2010; 30: 423-40.
- [30]Silvestri C, Ligresti A, Di Marzo V. Peripheral effects of the endocannabinoid system in energy homeostasis: adipose tissue, liver and skeletal muscle. *Rev Endocr Metab Disord* 2011; 12: 153-62.
- [31]Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 369-83.
- [32]Scherer T, Buettner C. Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2011; 12: 235-43.
- [33]Hochberg I, Hochberg Z. Expanding the definition of hypothalamic obesity. *Obes Rev* 2010; 11: 709-21
- [34]Cardinal P, Bellocchio L, Clark S, Cannich A, Klugmann M, Lutz B, et al. Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology* 2012; 153: 4136-43
- [35]Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.
- [36]Engeli S. Central and peripheral cannabinoid receptors as therapeutic targets in the control of food intake and body weight. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 209: 357-81.
- [37]Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2010; 59: 926-34.



- [38] Vettor R, Pagano C. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 51-63.
- [39] Priego T, Sánchez J, Picó C, Palou A. Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet. *Obesity* 2008; 16: 819-26.
- [40] Boizard M, Le Liepvre X, Lemarchand P, Fougelle F, Ferré P, Dugail I. Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273: 29164-71
- [41] Zhao W, Fong O, Muise ES, Thompson JR, Weingarh D, Qian S, et al. Genome-wide expression profiling revealed peripheral effects of cannabinoid receptor 1 inverse agonists in improving insulin sensitivity and metabolic parameters. *Mol Pharmacol* 2010; 78: 350-9.
- [42] Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 26: 244-51.
- [43] Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 244-51.
- [44] Rhines SD, Heins JR. Pharmacotherapy for obesity and weight loss. *S D Med*. 2013 Nov;66(11):471, 473
- [45] Lin Y, Shia KS, Hsiao WC, Hsieh WP, Yeh TK, Tseng SL et al. Biphasic suppression of appetite by cannabinoid CB1 receptor antagonists with distinct functional activities. *Pharmacol Res* 2010; 62: 337-43.
- [46] Christopoulou FD, Kiortsis DN. An overview of the metabolic effects of rimonabant in randomized controlled trials: potential for other cannabinoid 1 receptor blockers in obesity. *J Clin Pharm Ther* 2011; 36: 10-8.
- [47] Després JP, Golay A, Sjöström L; Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 2121-34.

- [48] Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J; RIO-North America Study Group. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 761-75.
- [49] Van Gaal LF, Scheen AJ, Rissanen AM, Rössner S, Hanotin C, Ziegler O; RIO-Europe Study Group. Long-term effect of CB1 blockade with rimonabant on cardiometabolic risk factors: two year results from the RIO-Europe Study. *Eur Heart J* 2008; 29: 1761-71.
- [50] Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2007; 370: 1706-13.
- [51] Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z et al. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis* 2010; 39: 148-55.
- [52] Kirilly E, Gonda X, Bagdy G. CB1 receptor antagonists: new discoveries leading to new perspectives. *Acta Physiol* 2012; 205: 41-60.
- [53] Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 95: 375-82.
- [54] Wu YK, Yeh CF, Ly TW, Hung MS. A new perspective of cannabinoid 1 receptor antagonists: approaches toward peripheral CB1R blockers without crossing the blood-brain barrier. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 1421-29.
- [55] Ward SJ, Raffa RB. Rimonabant redux and strategies to improve the future outlook of CB1 receptor neutral-antagonist/inverse-agonist therapies. *Obesity* 2011; 19: 1325-34.
- [56] Meye FJ, Trezza V, Vanderschuren LJ, Ramakers GM, Adan RA. Neutral antagonism at the cannabinoid 1 receptor: a safer treatment for obesity. *Mol Psychiatry*. 2013 Dec;18(12):1294-301.

- [57]Lazzari P, Loriga G, Manca I, Pinna GA, Pani L, Pharmaceutical compounds, US Patent Application No: 2010/0215741, 2010;
- [58]RamaRao V. V. V. N. S., Venkat Reddy G., Maitraie D., Ravikanth S., Yadla R., Narsaiah B., Shanthan Rao P., Tetrahedron, 2004, 60, 12231-12237.
- [59]J.-M. Mussinu, S. Ruiu, A. C. Mule` , A. Pau, M. A. M. Carai, G. Loriga, G. Murineddu and G. A. Pinna, Bioorg. Med. Chem. 2008, 11, 251-263.
- [60]Lazzari, P.; Ruiu, S.; Pinna, G.A., Murineddu, G. U.S. Patent 2010/0216785 A1.
- [61]Makriannis, A.; Liu, Q.; Thotapally, R. U.S. Patent 7,393,842B2, 2008.
- [62]Lazzari P, Ruiu S, Pinna GA, Murineddu G, Tricyclic pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. European Patent No: EP 1,602,658, 2011.
- [63]Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. Life Sci 2005; 76: 1307-24.
- [64]Greig IR, Ross RA, Pertwee RG, US Patent Application No.: 20100022611, 2010.
- [65]Oprea TI, Gottfries J. Toward minimalistic modeling of oral drug absorption. J Mol Graph Model. 1999 Oct-Dec;17(5-6):261-74, 329.
- [66]Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Delivery Rev. 23, 1997, 3-25.
- [67]Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. J. Pharm. Tox. Meth. 44, 2000, 235-249.
- [68]Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R and Martin BR. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. 1994 J Pharmacol Exp Ther 270:219–227.

- [69]Rinaldi-Carmona M, Barth F, He´aulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Ne´liat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994, 350:240–244.
- [70]Mastinu A, Pira M, Pani L, Pinna GA, Lazzari P. NESS038C6, a novel selective CB1 antagonist agent with anti-obesity activity and improved molecular profile. *Behav Brain Res* 2012; 234: 192-204.
- [71]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; 217: 432-8.
- [72]Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- [73]Manca I, Mastinu A, Olimpieri F, Falzoi M, Sani M, Ruiu S et al. Novel pyrazole derivatives as neutral CB1 antagonists with significant activity towards food intake. *Eur J Med Chem* 2013; 62: 256-69.
- [74]Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 2005; 76: 1307-24.
- [75]Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes* 2006; 30 Suppl 1: S13-8.
- [76]Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. 1958. *Br J Pharmacol.* 1997 Feb;120(4 Suppl):151-61
- [77]Lazzari P, Murineddu G, Manca I, Loriga G, Pinna GA. Myrtanil substituent in 3 position of pyrazole ring determines CB1 agonism of novel 4,5-dihydrobenzo-oxa-cycloheptapyrazole cannabinoids. In: Research Triangle Park, NC, USA, editor. *International Cannabinoid Research*

Society. Symposium on the Cannabinoids: Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Annual International Cannabinoid Research Society; 2012 July 22-27, Freiburg, Germany, 2012, P3-18.

[78]Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Nov;22(11):565-72

[79]Rosini TC, Silva AS, Moraes Cd. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58: 383-7.

[80]Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007; 15: 798-808.

[81]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; 217: 432-8.

[82]Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005; 8: 585-9.

[83]Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, et al. CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 293-300.

[84]Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, et al. Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 2010; 13: 281-3.

[85]McDonald SD, Pesarchuk E, Don-Wauchope A, El Zimaity H, Holloway AC. Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight. *Nutr Res* 2011; 31: 707-14.

[86]Van Proeyen K, Szlufcik K, Nielens H, Pelgrim K, Deldicque L, Hesselink M, et al. Training in the fasted state improves glucose tolerance during fat-rich diet. *J Physiol* 2010; 588: 4289-302.

- [87]Rodríguez-Hernández H, Cervantes-Huerta M, Rodríguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Decrease of aminotransferase levels in obese women is related to body weight reduction, irrespective of type of diet. *Ann Hepatol* 2011; 10: 486-92.
- [88]Bellocchio L, Mancini G, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. Cannabinoid receptors as therapeutic targets for obesity and metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 586-91.
- [89]Jourdan T, Demizieux L, Gresti J, Djaouti L, Gaba L, Vergès B, et al. Antagonism of peripheral hepatic cannabinoid receptor-1 improves liver lipid metabolism in mice: evidence from cultured explants. *Hepatology* 2012; 55: 790-9.
- [90]Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 2010; 120: 2953-66.
- [91]Nam DH, Lee MH, Kim JE, Song HK, Kang YS, Lee JE, et al. Blockade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in db/db mice. *Endocrinology* 2012; 153: 1387-96.
- [92]Valentino MA, Lin JE, Waldman SA. Central and peripheral molecular targets for antiobesity pharmacotherapy. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87: 652-62.
- [93]Rodgers RJ, Tschöp MH, Wilding JP. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis Model Mech* 2012; 5: 621-6.
- [94]Kim GW, Lin JE, Valentino MA, Colon-Gonzalez F, Waldman SA. Regulation of appetite to treat obesity. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011; 4: 243-59.
- [95]Engeli S. Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol* 2008; 54: 2838-43.
- [96]Klempel MC, Varady KA. Reliability of leptin, but not adiponectin, as a biomarker for diet-induced weight loss in humans. *Nutr Rev* 2011; 69: 145-54

- [97]Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2563-68.
- [98]Nathan PJ, O'Neill BV, Napolitano A, Bullmore ET. Neuropsychiatric adverse effects of centrally acting antiobesity drugs. *CNS Neurosci Ther* 2011; 17: 490-505.
- [99]McLaughlin PJ. Reports of the death of CB1 antagonists have been greatly exaggerated: recent preclinical findings predict improved safety in the treatment of obesity. *Behav Pharmacol* 2012; 23: 537-50.
- [100]Silvestri C, Di Marzo V. Second generation CB1 receptor blockers and other inhibitors of peripheral endocannabinoid overactivity and the rationale of their use against metabolic disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21: 1309-22.
- [101]Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, et al. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 585-640.
- [102]Zhao Z, Zhang HT, Bootzin E, Millan MJ, O'Donnell JM. Association of changes in norepinephrine and serotonin transporter expression with the long-term behavioral effects of antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 1467-81.
- [103]Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig* 2010; 7: 231-5.
- [104]Chourbaji S, Brandwein C, Gass P. Altering BDNF expression by genetics and/or environment: impact for emotional and depression-like behaviour in laboratory mice. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 599-611.
- [105]Takahashi E, Katayama M, Niimi K, Itakura C. Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests. *Eur J Pharmacol* 2008; 589: 149-56.

- [106] Spiga S, Lintas A, Migliore M, Diana M. Altered architecture and functional consequences of the mesolimbic dopamine system in cannabis dependence. *Addict Biol* 2010; 15: 266-76.
- [107] Spiga S, Lintas A, Diana M. Altered Mesolimbic Dopamine System in THC Dependence. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9: 200-4.
- [108] Umathe SN, Manna SS, Jain NS. Involvement of endocannabinoids in antidepressant and anti-compulsive effect of fluoxetine in mice. *Behav Brain Res* 2011; 223: 125-34.
- [109] McLaughlin RJ, Hill MN, Dang SS, Wainwright SR, Galea LA, Hillard CJ, et al. Upregulation of CB(1) receptor binding in the ventromedial prefrontal cortex promotes proactive stress-coping strategies following chronic stress exposure. *Behav Brain Res* 2013; 237: 333-7.
- [110] Dubreucq S, Kambire S, Conforzi M, Metna-Laurent M, Cannich A, Soria-Gomez E, et al. Cannabinoid type 1 receptors located on single-minded 1-expressing neurons control emotional behaviors. *Neuroscience* 2012; 204: 230-44.
- [111] Ganon-Elazar E, Akirav I. Cannabinoids prevent the development of behavioral and endocrine alterations in a rat model of intense stress. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 456-66
- [112] Willemsen MJ, Mantel-Teeuwisse AK, Buggy Y, Layton D, Straus SM, Leufkens HG, et al. Reasons for and time to discontinuation of rimonabant therapy: a modified prescription-event monitoring study. *Drug Saf* 2012; 35: 1147-58.



## 8. ELENCO PUBBLICAZIONI

1. **Mastinu A**, Pira M, Pinna GA, Pisu C, Casu MA, Reali R, Marcello S, Murineddu G, Lazzari P. *NESS06SM reduces body weight with an improved profile relative to SR141716A*. Pharmacological Research, **2013** Aug; 74:94-108.
2. Manca I, **Mastinu A**, Olimpieri F, Falzoi M, Sani M, Ruiu S, Loriga G, Volonterio A, Tambaro S, Bottazzi ME, Zanda M, Pinna GA, Lazzari P. *Novel pyrazole derivatives as neutral CB(1) antagonists with significant activity towards food intake*. Eur J Med Chem. **2013** Jan 11;62C:256-269.
3. Lazzari P, Pau A, Tambaro S, Asproni B, Ruiu S, Pinna G, **Mastinu A**, Curzu MM, Reali R, Bottazzi ME, Pinna GA, Murineddu G. *Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel 4-Alkyl-5-thien-2'-yl Pyrazole Carboxamides*. Cent Nerv Syst Agents Med Chem **2012**;12(4):254-76.
4. **Mastinu A**, Pira M, Pani L, Pinna G A, Lazzari P. *NESS038C6, a novel selective CBI antagonist agent with anti-obesity activity and improved molecular profile*. Behav Brain Res **2012**, 2:192-204;
5. 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**, 217: 432-8;