

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari

Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche  
XXVIII ciclo



**EFFETTO DELLA VELOCITA' DI ASSUNZIONE DI CIBO E  
DELLA PALATABILITA' SULLA SECREZIONE DI PEPTIDI  
GASTROINTESTINALI NELL'OBESITA' SEMPLICE E GENETICA**

Tutor: Prof. Silvano G. Cella

Co-Tutor: Dott. Antonello E. Rigamonti

Coordinatore Dottorato: Prof. Alberto Corsini

Tesi di Dottorato di:

Silvia Bini

R10111

Anno Accademico 2014-2015

# INDICE

---

RIASSUNTO.....	4
INTRODUZIONE.....	8
CONTROLLO FISIOLÓGICO DELL'ASSUNZIONE DI CIBO .....	8
Neuropeptidi ipotalamici .....	9
La fame edonica: il circuito gratificazione-piacere.....	10
Fattori sensoriali .....	15
SEGNALI PERIFERICI DI ADIPOSITA' .....	17
Leptina .....	17
Adiponectina.....	18
Insulina.....	18
SEGNALI PERIFERICI PROVENENTI DAL TRATTO GASTROINTESTINALE ...	19
Ghrelin.....	19
Colecistochinina (CCK).....	21
PYY .....	22
Prodotti del proglucagone: GLP-1, GLP-2 e ossintomodulina .....	25
OBESITÀ.....	28
Classificazione.....	28
Alterazioni Endocrine.....	31
Approcci terapeutici nell'obesità .....	33
SINDROME DI PRADER-WILLI.....	41
Genetica ed eziologia .....	41
Epidemiologia .....	43
Diagnosi e quadro clinico.....	43
Anomalie neuroendocrine e metaboliche .....	44
Terapia con GH .....	45
Alterazioni peptidergiche nei pazienti con PWS.....	46
SCOPO DELLA RICERCA.....	49
Studio I.....	51
Studio II.....	51
Studio III.....	52
MATERIALI E METODI.....	54
STUDIO I.....	54
Soggetti .....	54
Procedura sperimentale.....	55

Analisi biochimiche .....	56
Analisi statistica .....	56
<b>STUDIO II.....</b>	<b>57</b>
Soggetti .....	57
Procedura sperimentale.....	58
Analisi biochimiche .....	59
Analisi statistica .....	60
<b>STUDIO III.....</b>	<b>60</b>
Soggetti .....	60
Procedura sperimentale.....	61
Analisi biochimiche .....	63
Analisi statistica .....	64
<b>RISULTATI .....</b>	<b>66</b>
STUDIO I.....	66
STUDIO II.....	76
STUDIO III.....	86
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>94</b>
STUDIO I.....	96
STUDIO II.....	100
STUDIO III.....	104
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>118</b>

# RIASSUNTO

---

La regolazione dell'assunzione di cibo e del peso corporeo è un complesso meccanismo fisiologico che coinvolge circuiti nervosi centrali e periferici. A livello centrale, l'ipotalamo è la sede anatomica che presiede al controllo dell'appetito e dell'assunzione di cibo. Il nucleo arcuato ha un ruolo cruciale nell'integrazione dei segnali regolatori del comportamento alimentare e dell'omeostasi energetica. Esso presenta due principali popolazioni di neuroni, POMC/CART e NPY/AgRP, i quali esercitano azione anoressizzante ed oressizzante, rispettivamente, in risposta alla modulazione di ormoni provenienti dal tessuto adiposo e dal tratto gastrointestinale, come il peptide YY (PYY), il peptide glucagone simile-1 (GLP-1) e ghrelina. L'azione di questi peptidi interessa anche le aree corticali superiori e le regioni limbiche, modulando così alcuni aspetti edonistici dell'appetito. Infatti, oltre agli effetti sui meccanismi omeostatici, il cibo influenza anche i sistemi cerebrali associati con il piacere e la ricompensa.

L'obesità è una malattia cronica ad eziologia multifattoriale in cui l'alterazione del bilancio energetico porta all'accumulo eccessivo di tessuto adiposo nell'organismo. Gli interventi dietetici o le modificazioni dello stile di vita nei pazienti gravemente obesi offrono spesso scarsi risultati, mentre la chirurgia bariatrica, come *sleeve gastectomy* in laparoscopia (LSG) rappresenta, ad oggi, la terapia più promettente. Nonostante siano stati pubblicati primi risultati entusiasmanti sulla perdita di peso conseguente a LSG, il meccanismo sottostante la perdita di peso rimane ancora da chiarire. Particolare importanza è stata attribuita alle riduzioni post-operatorie dei livelli circolanti del peptide oressigenico ghrelina, prodotto da specifiche cellule neuroendocrine localizzate nel fondo gastrico, rimosso durante LSG.

Attualmente, più di due miliardi di adulti e bambini nel mondo sono in sovrappeso o obesi. Tale fenomeno può essere in parte attribuibile ad un comportamento alimentare scorretto. Indubbiamente, lo stressante stile di vita della civiltà moderna ha contribuito a promuovere l'assunzione rapida dei pasti di grande dimensione e, di conseguenza, un bilancio energetico fortemente positivo. Inoltre, nella società occidentale è disponibile una grande varietà di cibi palatabili, ad alto contenuto energetico e di facile consumo. Questo tipo di

alimenti promuove un bilancio energetico positivo, in quanto possiede ridotti effetti sazianti per unità energetica.

I comportamenti alimentari sono da tempo di interesse, come fattori che contribuiscono allo sviluppo dell'obesità. Per esempio è stato dimostrato che esiste una correlazione positiva tra velocità nel mangiare e l'indice di massa corporea (BMI). La velocità di assunzione di cibo, infatti, influisce sul rilascio dei peptidi GLP-1 e PYY. Mangiare ad un ritmo fisiologicamente moderato sembra aumentare le risposte post-prandiali degli ormoni gastrointestinali anoressizzanti in soggetti sani magri. Inoltre, in soggetti normopeso il consumo di cibo palatabile è associato all'aumento dei livelli circolanti di ghrelina e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG).

La migliore conoscenza riguardo i meccanismi patofisiologici e neurocomportamentali sottostanti l'obesità è necessaria per prevenire comportamenti rischiosi e per lo sviluppo di nuove terapie efficaci.

L'effetto anoressizzante del PYY è mantenuto in pazienti obesi, anche se i livelli del peptide sono ridotti a digiuno e in fase postprandiale. Inoltre, i soggetti obesi mostrano livelli più bassi di ghrelina che possono aumentare a seguito della perdita di peso raggiunta sia solo con la dieta che con la combinazione di dieta ed esercizio fisico. Contrariamente vi è un disaccordo riguardo l'esistenza di una disregolazione di questi ormoni nell'iperfagia associata all'obesità sindromica, come la sindrome di Prader-Willi (PWS).

Di conseguenza, considerando il ruolo cruciale dei segnali periferici nella regolazione fisiologica ed edonica dell'assunzione di cibo e nella fisiopatologia di diversi disordini alimentari, nel presente lavoro di tesi si è voluto studiare dinamicamente la loro secrezione in funzione dei comportamenti alimentari che possono contribuire allo sviluppo di obesità.

Precisamente, sono stati condotti tre studi:

- I. effetto della velocità dell'assunzione di cibo sulla secrezione postprandiale di PYY e GLP-1 in adulti con sindrome di Prader-Willi;
- II. effetto della velocità dell'assunzione di cibo sulla secrezione postprandiale di PYY e GLP-1 in adulti obesi prima e dopo essere stati sottoposti all'intervento di *sleeve gastrectomy* in laparoscopia;

- III. effetto dell'assunzione di cibo palatabile sulla secrezione di PYY, GLP-1, ghrelina ed endocannabinoidi (eCBs) in adulti obesi precedentemente saziati.

Studio I: sono stati misurati i livelli postprandiali di PYY e GLP-1 a seguito dell'assunzione di un pasto (gelato) a due velocità differenti, 5 min (*fast feeding*) e 30 min (*slow feeding*), in 6 pazienti PWS, 9 pazienti obesi e 4 soggetti normopeso adulti. Entrambe le velocità di assunzione del pasto stimolavano il rilascio di GLP-1 nei soggetti normopeso, anche se si riscontrava un maggior effetto a seguito dello *slow feeding*. Contrariamente, nei pazienti con obesità semplice non si riscontrava alcuna differenza significativa nei livelli circolanti di GLP-1, durante entrambe le sessioni sperimentali. Inaspettatamente, solo il *fast feeding* stimolava il rilascio di GLP-1 negli adulti PWS. Le concentrazioni di PYY aumentavano in ciascun gruppo, indipendentemente dalla velocità di assunzione del pasto; anche se l'effetto era maggiore durante *slow feeding* e *fast feeding* rispettivamente nei soggetti normopeso e nei pazienti PWS.

Le valutazioni mediante scale visuoanalogiche (VASs) riportavano un minor senso di fame e un maggiore senso di sazietà dopo assunzione lenta e rapida del pasto, rispettivamente nei soggetti normopeso e nei pazienti PWS. Nei pazienti con obesità semplice, invece non si riscontrava alcuna differenza significativa per i punteggi delle VASs del senso di fame e di sazietà tra le due sessioni.

In conclusione, il *fast feeding* sembrerebbe provocare concentrazioni più levate dei peptidi anoressigenici gastroenterici e favorire il senso di sazietà in soggetti PWS adulti e non in soggetti con obesità semplice, suggerendo l'esistenza di un diverso substrato fisiopatologico nelle due diverse condizioni cliniche.

Studio II: sono state misurate le diverse risposte postprandiali di alcuni ormoni gastroenterici anoressigenici quando lo stesso pasto (gelato) veniva consumato a diverse velocità (*fast vs slow feeding*) in 10 pazienti obesi sottoposti a LSG. I livelli di GLP-1, PYY, glucosio, insulina e trigliceridi sono stati misurati prima e 3 mesi dopo LSG. Entrambe le velocità di assunzione del pasto non stimolavano il rilascio di GLP-1 sia in fase pre- che post-operatoria; mentre si riscontrava un aumento significativo dei livelli di PYY durante *fast* e *slow feeding*, solo in fase

post-LSG. Non si riscontravano differenze significative nei livelli postprandiali di GLP-1, confrontando *fast vs slow feeding* o la fase pre- e post-LSG. I livelli plasmatici di PYY erano più elevati in fase post-LSG ad entrambe le velocità di assunzione del pasto. Il *fast feeding* provocava un maggior senso di sazietà, rispetto allo *slow feeding*, sia in fase pre-LSG che post-LSG; mentre non veniva riscontrata nessuna differenza significativa per le VASs del senso di fame. In fase pre- e post- operatoria venivano misurati valori delle VASs per il senso di fame e di sazietà simili dopo l'assunzione del pasto.

Queste evidenze suggeriscono quindi un contributo trascurabile da parte dei peptidi anoressigenici gastroenterici, sulla perdita di peso indotta da LSG.

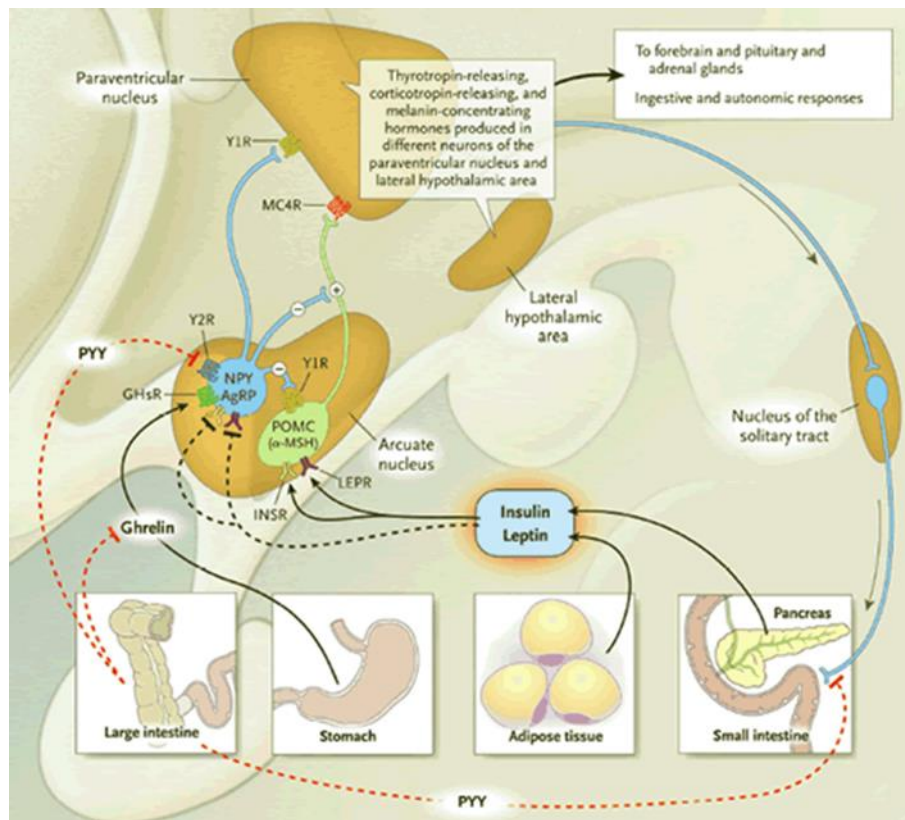
Studio III: sono stati misurati i livelli di GLP-1, PYY, anandamide (AEA), 2-AG, palmitoiletanolamide (PEA), e oleiletanolamide (OEA) in 10 soggetti con obesità semplice precedentemente saziati, dopo esposizione/assunzione di cibo palatabile (cioccolato) e di cibo non-palatabile con lo stessa composizione calorica e bromatologica (pane e burro).

La fase anticipatoria e il consumo del cibo palatabile erano associate ad un aumento dei livelli circolanti di ghrelina, AEA, 2-AG e OEA. Contrariamente, i livelli di GLP-1, PYY e PEA non differivano prima e dopo l'esposizione/assunzione del cioccolato o del cibo non-palatabile. I punteggi riportati nelle VASs, per il senso di fame e di sazietà, erano rispettivamente maggiori e minori durante la sessione edonica, rispetto a quella non-palatabile. In conclusione, quando la motivazione a mangiare viene generata dall'esposizione e dal consumo di cioccolato, nei soggetti obesi si osserva l'attivazione di specifici segnali endogeni *reward* come ghrelina, AEA e 2-AG. Questi risultati potrebbero suggerire che l'impiego di antagonisti puri di ghrelina e eCBs potrebbe essere efficace nel trattamento dell'iperfagia legata all'obesità.

# INTRODUZIONE

## CONTROLLO FISIOLOGICO DELL'ASSUNZIONE DI CIBO

La regolazione dell'assunzione di cibo e del peso corporeo è un complesso meccanismo fisiologico che coinvolge circuiti nervosi centrali e periferici. Il sistema nervoso centrale (SNC) riceve segnali dalla periferia che lo informano circa la disponibilità dei substrati e dei nutrienti, sullo stato dei depositi di energia e sulle necessità della loro utilizzazione in rapporto alle diverse condizioni. I circuiti neuronali centrali sono modulati da ormoni sintetizzati dal tessuto adiposo, che riflettono lo stato nutrizionale a lungo termine, e da ormoni gastrointestinali circolanti che causano stimolazione dell'appetito o della sazietà.



**Fig. 1. Interazioni tra vie ormonali e neurali nella regolazione dell'assunzione di cibo e della massa grassa.** Le linee tratteggiate indicano effetti ormonali inibitori, le linee continue quelli stimolatori. Il nucleo arcuato e paraventricolare contengono neuroni capaci di stimolare o inibire l'assunzione di cibo. LEPR e INSR rappresentano rispettivamente il recettore per leptina e per insulina.



## Neuropeptidi ipotalamici

L'ipotalamo rappresenta la principale regione anatomica coinvolta nella regolazione dell'assunzione di cibo. Il nucleo arcuato (ARC) ipotalamico svolge un ruolo cruciale nell'integrazione dei segnali regolatori del comportamento alimentare e dell'omeostasi energetica (Cone RD et al. 2001). Esso presenta due principali popolazioni di neuroni: un circuito neuronale inibisce l'assunzione di cibo tramite l'espressione dei neuropeptidi pro-opiomelanocortinici, precursori della melanocortina (POMC) e del trascritto regolato da cocaina ed amfetamina (CART) (Elias CF et al., 1998, Kristensen P et al., 1998); l'altro circuito stimola l'assunzione di cibo tramite l'espressione del neuropeptide Y (NPY) e del peptide correlato alla proteina agouti (AgRP) (Hahn TM et al., 1998). Questi assoni neuronali definiti "di prim'ordine" proiettano su "neuroni di secondo ordine", localizzati a livello del nucleo ipotalamico paraventricolare (PVN), dorso-mediale (DMN), ventromediale (VMN) e laterale (LH), che elaborano le informazioni relative all'omeostasi energetica (Valassi E et al., 2008).

Il POMC è una proteina di grandi dimensioni, precursore di una varietà di prodotti più piccoli, in particolare dell'ormone melanocito-stimolante  $\alpha$  che agisce sui recettori della melanocortina (Mcr3 e Mcr4), principalmente espressi a livello dell'ARC, riducendo l'assunzione di cibo (Schwartz MW et al. 2000). Dal processo di clivaggio del POMC, originano anche peptidi oppioidi, comprendenti ad esempio  $\beta$ -endorfina, che agiscono a livello centrale incrementando nel roditore particolarmente l'assunzione di cibo palatabile (Levine AS et al. 1985).

CART è co-localizzata con POMC a livello del ARC (Valassi E et al., 2008) e sembra avere un effetto sia oressigenico che anoressigenico a seconda del sito in cui agisce. Nei topi e nei ratti, la somministrazione centrale intracerebroventricolare (icv) della CART riduce l'assunzione di cibo (Kristensen P et al., 1998), mentre la somministrazione di CART direttamente nel ARC aumenta l'assunzione di cibo (Abbott CR et al., 2001). Di conseguenza il ruolo di CART nella regolazione di assunzione di cibo è ancora poco chiaro. Questi dati potrebbero suggerire l'esistenza di due diversi circuiti ipotalamici di CART, uno oressigenico e l'altro anoressigenico.

NPY stimola l'assunzione di cibo, agendo principalmente sui recettori NPY1R e NPY5R, che sono concentrati soprattutto nelle aree ipotalamiche che includono

il PVN, il VMN e LH. (Wang YC et al., 2011; Swinburn BA et al., 2004). Allo stesso tempo AgRP inibisce Mcr3 e Mcr4, principalmente localizzati nel PVN (Quillan JM et al., 1998). Di conseguenza, l'attivazione dei neuroni che esprimono NPY e AgRP, ha un duplice effetto oressigenico: attivare *signaling* oressigenici (attraverso i recettori NPY) e inibire il *signaling* anoressigenico (attraverso i recettori melanocortinici).

Di estrema importanza per la regolazione del bilancio energetico sono le fibre provenienti dal nucleo del tratto solitario (NTS), collocato alla base del 4° ventricolo, e dirette all'ipotalamo. I segnali di sazietà a breve termine vengono convogliati al NTS principalmente attraverso le fibre afferenti vagali (Travagli RA, et al., 2006). Il consumo di cibo stimola i nervi afferenti vagali sia attraverso la distensione gastrica per attivazione dei meccanorecettori gastrici sia mediante gli ormoni anoressigenici a breve termine per interazione con i loro recettori affini espressi a livello delle fibre vagali (Moran TH et al., 1997; Moran TH et al., 1998; Suzuki K et al., 2012; Hisadome K et al., 2010).

### **La fame edonica: il circuito gratificazione-piacere**

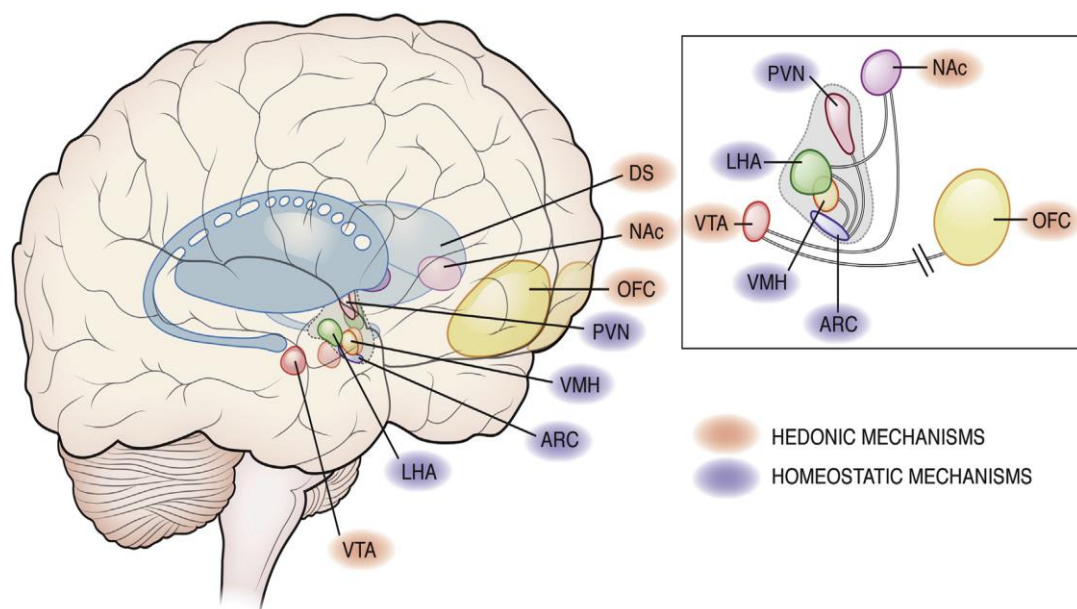
L'ipotalamo riceve anche numerose vie neuronali da diverse strutture del sistema limbico. Infatti, oltre agli effetti sui meccanismi omeostatici, il cibo influenza anche i sistemi cerebrali associati con il piacere e la ricompensa. Classicamente si considera che questo sistema sia costituito dalle seguenti strutture: corteccia prefrontale, ippocampo, ipotalamo, talamo. Al suo interno si trovano alcuni nuclei fondamentali come l'abenula, l'amigdala, e i nuclei dorsale (i gangli della base) e ventrale (nucleo accumbens, formato da una parte detta core e una parte detta shell). I centri cerebrali che controllano i meccanismi della gratificazione furono identificati nel 1954 da James Olds e Peter Milner (Olds et al., 1954), che osservarono come l'autostimolazione elettrica volontaria operante sulle aree cerebrali del sistema limbico, potesse rappresentare un forte stimolo gratificante. Nei decenni successivi sono state identificate anche altre componenti fondamentali: il sistema neurotrasmettitoriale dopaminergico mesolimbico, che sembrerebbe controllare la spinta motivazionale per la ricerca dello stimolo gratificante; il sistema neurotrasmettitoriale oppioide, che medierebbe i processi di gratificazione conseguenti al consumo della sostanza; il sistema

glutaminergico, che modula il rilascio della dopamina in alcune aree cerebrali; e il sistema gabaergico, che inibisce il rilascio di dopamina a livello del sistema nervoso centrale.

Il sistema dopaminergico, costituito da un complesso di neuroni che utilizzano come neurotrasmettitore la dopamina, origina a livello di due nuclei del tronco encefalico, A9 e A10. Dal nucleo A9 partono le proiezioni verso caudato e putamen, aree che controllano il movimento. Dal nucleo A10 (area ventro tegmentale o VTA) partono le proiezioni verso una struttura complessa denominata amigdala estesa, che comprende il sistema mesolimbico (formato dal nucleo accumbens (NAc), la stria terminale, il tubercolo olfattorio) e il sistema mesocorticale (formato da aree della corteccia che controllano le funzioni cognitive). I recettori dopaminergici D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub> sono localizzati in diversi distretti cerebrali, incluso il NAc (Ikemoto S et al., 1997). Nei processi ricompensa è altrettanto importante il sistema oppioidergico, che include i peptidi oppioidi endogeni come le encefaline, dinorfine e  $\beta$ -endorfine, e i loro rispettivi recettori  $\delta$ ,  $\kappa$  e  $\mu$ . I peptidi oppioidi endogeni e i loro recettori sono distribuiti per tutto il cervello, ma quelli maggiormente associati con la ricompensa legata al cibo sono localizzati nel VTA, NAc e nel pallidum ventrale (Le Merrer J et al., 2009).

La via dopaminergica mesolimbica, che collega l'area tegmentale ventrale al nucleo accumbens, opera come una sorta di interruttore della gratificazione, segnalando agli altri centri cerebrali quanto è piacevole una certa attività. Più alta è la gratificazione, più è possibile che l'organismo registri e memorizzi l'azione e la ripeta. La tendenza verso l'obesità è direttamente collegata a questo sistema, il cui studio ha dimostrato l'esistenza di un incremento di livelli di dopamina extracellulare e dei suoi metaboliti all'interno del nucleo accumbens dopo l'ingestione di cibo altamente appetitoso. Recentemente (Geiger BM et al. 2009) è stato dimostrato un legame tra predisposizione all'obesità e deficit di dopamina nel sistema mesolimbico in animali da laboratorio. L'idea che la diminuzione di dopamina porti a un aumento del consumo di cibi ipercalorici e appetibili è compatibile con studi effettuati sull'uomo (Wang GJ et al., 2001), dove si è visto che negli individui obesi i livelli dei recettori della dopamina D<sub>2</sub> sono significativamente ridotti. Farmaci psicoattivi quali la marijuana, l'etanolo ma anche stimoli piacevoli o cibi gustosi, sono noti indurre il rilascio di dopamina in specifiche regioni cerebrali.

Il sistema mesolimbico dopaminergico codifica il senso di “piacere” e di “gratificazione” correlato ai cibi palatabili e viene al contempo modulato dai circuiti omeostatici e dagli ormoni di sazietà e adiposità (Rui L, 2013). Un ruolo come mediatore dei processi di gratificazione, è stato dimostrato anche per l’ormone peptidico oressigenico ghrelina prodotto a livello gastrointestinale (Jerlhag E et al., 2007; Dickson SL et al., 2011). Infatti, il recettore della ghrelina; GHS-R1a, e’ espresso non solo a livello ipotalamico, ma anche nelle aree mesolimbiche e tegmentali coinvolte nel circuito gratificazione-piacere, come VTA, o le aree tegmentali laterodorsali (LDTg); inoltre la somministrazione di ghrelina intra-VTA o intra-LDTg è in grado di promuovere il rilascio di dopamina a livello del nucleo accumbens (Jerlhag E et al., 2007)



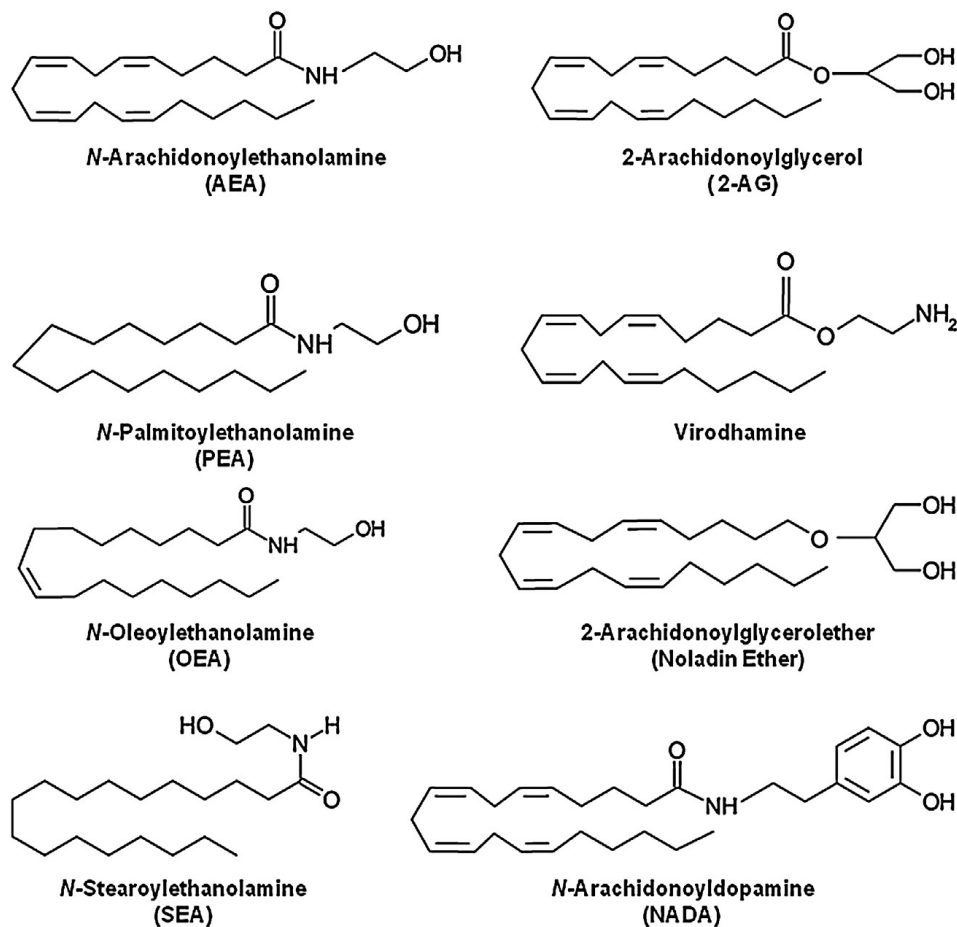
**Fig. 2. Aree neurali associate con il consumo di cibo.** In questo schema semplificato, i nuclei ipotalamici si pensa possano contribuire maggiormente al signaling omeostatico, mentre le regioni striatali, tegmentali e della corteccia prefrontale sono associate con i processi edonici e basati sul piacere. Le connessioni primarie tra le regioni specifiche sono mostrate nell' inserto. DS, striatum dorsale; LHA, area ipotalamica laterale; OFC, corteccia orbitofrontale.

### ***Il sistema endocannabinoide***

Il sistema endocannabinoide partecipa alla modulazione dei circuiti del piacere e la manipolazione di questo sistema è in grado di influenzare i comportamenti legati alla gratificazione. L’elevata espressione di recettori endocannabinoidi di tipo 1 (CB1) in aree coinvolte nel piacere costituisce una forte indicazione del diretto coinvolgimento del sistema nelle diverse funzioni psicologiche regolate da queste regioni del cervello, incluso l’appetito. Vi è quindi una forte correlazione

tra i livelli limbici di endocannabinoidi e di dopamina e l'aumento del desiderio per il cibo gustoso.

I principali endocannabinoidi (eCBs) sono derivati dell'acido arachidonico coniugati con etanolamina, come N-arachidonoiletanolamina (AEA), o con glicerolo per formare monoacilgliceroli, come 2-arachidonoilglicerolo (2-AG). Esistono altri acidi grassi amidati, come il soppressore dell'appetito N-oleoiletanolamina (OEA) (Fu J et al., 2008), l'agente antiinfiammatorio, anticonvulsivante e antiproliferativo N-palmitoiletanolamide (PEA) (Lambert DM et al., 2001) e l'immunomodulatore N-stearoiletanolamina (SEA) (Maccarrone M et al., 2007).



**Fig. 3.** Strutture chimiche dei principali endocannabinoidi e dei loro composti correlati

AEA e 2-AG si comportano da agonisti sia per CB1 che per CB2. Numerosi studi farmacologici hanno suggerito l'esistenza di ulteriori recettori cannabinoidi (De Petrocellis L et al., 2001). Infatti, AEA sembrerebbe attivare anche il recettore GPR55 (Ryberg E et al., 2007) e il recettore vanilloide di tipo 1 (Ross RA, 2003). Inoltre, un numero crescente di evidenze suggeriscono che gli eCBs sono gli attivatori naturali dei recettori nucleari della famiglia dei recettori della

proliferazione perissosomiale (PPAR) (O'Sullivan SE et al., 2010). Per esempio, l'azione anoressizzante di OEA e POE esogeni sembrerebbe essere mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione PPAR nel piccolo intestino (Schwartz GJ et al., 2008; Piomelli D et al., 2013; Diep TA et al., 2011;). OEA e PEA potrebbero attivare GPR119 (Hansen KB et al., 2011; Overton HA et al., 2006) e il recettore vanilloide (De Petrocellis L et al., 2001; Ahern GP et al., 2003; Wang X et al., 2005), ma la somministrazione esogena di OEA mantiene un effetto anoressizzante in topi privo di GPR119 o del recettore vanilloide (LoVerme J et al., 2005; Lan H et al., 2009), effetto che viene perso in topi senza PPAR (Fu J et al., 2005).

La trasduzione del segnale attivata da CB1 è importante sia per le componenti edoniche sia per quelle motivazionali del sistema ricompensa, (Davis C et al., 2004), che interagiscono con le vie oppioidergiche e dopaminergiche (Kirkham TC et al., 2001; Verty ANA et al., 2004). Gli eCBs esogeni, attraverso la stimolazione di CB1, inibiscono il *signaling* glutamatergico nei neuroni POMC, riducendo in questo modo il rilascio di melanocortina, un mediatore anoressigenico (Hentges ST et al., 2005). Questa scoperta è stata supportata da ulteriori evidenze, dove la somministrazione icv di antagonisti CB1 possono attenuare gli effetti oressigenici degli antagonisti melanocortinici (Verty AN et al., 2004). Inoltre, a livello ipotalamico è fondamentale il ruolo di CB1 sugli effetti anoressizzanti mediati da leptina (Di Marzo V et al., 2001). Infatti, i livelli di eCBs in roditori geneticamente obesi deficitari di leptina o dei suoi recettori risultano essere elevati (Di Marzo V et al., 2001).

Nonostante il SNC sia stato riconosciuto a lungo come sede anatomica dove gli eCBs regolano l'alimentazione, diversi studi dimostrano che anche il *signalling* endocannabinoide nei tessuti periferici svolge un ruolo importante nell'omeostasi energetica. Per esempio, il tratto gastrointestinale è un sito per la produzione di eCBs. E' stato dimostrato che il nutrimento può influenzare i livelli di eCBs. Infatti, Gomez et al. (2002) hanno scoperto che dopo 24 h di digiuno, nei ratti i livelli di AEA nel piccolo intestino aumentavano di 7 volte. Inoltre, l'impiego dell'antagonista CB1 (SR141716) riduceva l'assunzione nei ratti sia a digiuno sia in quelli parzialmente saziati. Questo lavoro suggerisce che i livelli di eCBs sono responsivi alla condizione nutritiva.

Nuovi studi suggeriscono che i segnali endocannabinoidi nello stomaco potrebbero contribuire all'attrazione di molti mammiferi per i cibi grassi (Gomez R et al., 2002; Di Marzo V, 2011). I risultati mostrano che, in ratti falsamente nutriti con un pasto liquido ad alto contenuto di grassi si verifica l'accumulo di due eCBs primari, 2-AG e AEA, nel digiuno del piccolo intestino (DiPatrizio NV et al., 2011). Questo effetto è dovuto al concomitante aumento della produzione e riduzione della degradazione di queste due sostanze. E' importante sottolineare, che la transezione del nervo vago blocca l'effetto del falso apporto di grassi sulla mobilitazione di eCBs, suggerendo che i segnali gustativi provocati da questi nutrienti vengono trasmessi dal tronco encefalico all'intestino attraverso il nervo vago.

Il falso apporto di grassi modifica i livelli di eCBs solo nella parte prossimale del piccolo intestino, non in altri tessuti periferici o a livello cerebrale. Questo porta a domandarsi se tale cambiamento ristretto nel *signaling* endocannabinoide possa essere in grado di influenzare il comportamento alimentare. Per rispondere a questa domanda, i ratti sono stati incanalati con un catetere duodenale e basse concentrazioni dell'agonista inverso CB1, rimonabant, sono state infuse nell'intestino immediatamente prima il falso apporto di un pasto ad alto contenuto di grassi. Il blocco locale di CB1 nel piccolo intestino è stato in grado di ridurre marcatamente gli effetti del falso apporto di grassi (DiPatrizio NV et al., 2011). Inoltre, un effetto simile è stato osservato dopo la somministrazione sistemica dell'antagonista CB1 con accesso ristretto nel CNS (DiPatrizio NV et al., 2011). Di conseguenza, i segnali endocannabinoidi nello stomaco possono avere un ruolo cruciale nel meccanismo di *feedback* positivo orosensoriale che promuove l'apporto di grassi.

Questi risultati suggeriscono che le strategie terapeutiche finalizzate al contenimento dell'attività endocannabinoide del piccolo intestino-per esempio, antagonisti CB1 limitati alla periferia, potrebbero aiutare a ridurre l'assunzione eccessiva di cibi grassi e a controllare il sovrappeso nell'obesità.

## **Fattori sensoriali**

L'assunzione di cibo può provocare una sensazione piacevole e gratificante che può indurre il soggetto ad alimentarsi anche in mancanza di un deficit di energia.

Questa sensazione è comunque influenzata anche dallo stato energetico dell'organismo, infatti la palatabilità di un alimento cambia se il soggetto è affamato o sazio. Dopo il pasto, quando i segnali di sazietà sono presenti, le proprietà sensoriali del cibo non vengono più percepite come piacevoli e non si avverte più la sensazione di appetito. L'integrazione tra segnali di sazietà e segnali sensoriali, che includono la vista, il profumo e il gusto di un alimento, avviene a livello della corteccia orbitofrontale. I neuroni presenti in questa regione cerebrale determinano quanto gradevole è un alimento, ma solo se il soggetto ha appetito per tale alimento. La corteccia orbitofrontale è in comunicazione con l'ipotalamo a cui invia le informazioni sensoriali e dal quale riceve i segnali di fame/sazietà dell'organismo (Rolls ET, 2005; Rolls ET, 2006). Il circuito neuronale responsabile della genesi di queste sensazioni è molto complesso e coinvolge diversi sistemi di segnale, come gli oppioidi, gli eCBs e il sistema dopaminergico. Un ruolo molto importante è svolto anche dal nucleo accumbens; la somministrazione di agonisti oppioidi e agonisti dopaminergici in questa regione stimola l'ingestione di cibi gratificanti come saccarosio e grassi (Zhang M et al., 2003). La quantità e la qualità di cibo ingerite in un pasto dipende anche da un meccanismo definito "sazietà sensoriale-specifica", cioè dalla diminuzione dell'appetito per un cibo particolare durante il pasto, senza perdita dell'appetito per altri alimenti; questo garantisce l'apporto di tutti i nutrienti necessari durante il pasto. La disponibilità di un numero sempre crescente di alimenti può portare a introdurre più cibo rispetto alle esigenze dell'individuo durante il pasto e nel lungo termine ad un progressivo aumento ponderale (Rolls BJ et al. 1983). Negli ultimi anni inoltre gli stimoli prodotti dal gusto, dal profumo e dall'aspetto del cibo e la sua disponibilità sono notevolmente aumentati, mentre i segnali di sazietà prodotti dalla distensione gastrica o dagli ormoni del tratto gastrointestinale sono rimasti invariati; questo si traduce in una maggior rilevanza della palatabilità del cibo rispetto ai segnali di sazietà e quindi in una tendenza alla eccessiva introduzione di cibo (Rolls ET, 2007).



## **SEGNALI PERIFERICI DI ADIPOSITA'**

Il tessuto adiposo produce molecole molto importanti nel controllo della spesa energetica e del comportamento alimentare, le adipocitochine.

### **Leptina**

La leptina è un ormone proteico principalmente prodotto e secreto a livello del tessuto adiposo bianco che svolge un ruolo importante nella regolazione dell'assunzione di cibo (sazietà e appetito) e della spesa energetica (Ahima RS et al., 2000). Il ruolo chiave della leptina consiste nel regolare l'appetito agendo attraverso la forma lunga del recettore della leptina (Ob-Rb) a livello del nucleo arcuato ipotalamico, dove la leptina attiva direttamente i neuroni POMC anoressizzanti e inibisce i neuroni AgRP/NPY oressigenici con conseguente riduzione complessiva dell'assunzione di cibo (Cowley MA et al., 2001). I livelli circolanti di leptina sono direttamente correlati con la massa di tessuto adiposo e sono ridotti durante i periodi di digiuno, mentre aumentano a seguito dell'assunzione di cibo (Bray GA, 2000; Friedman JM, 2004). Negli esseri umani, la condizione di carenza di leptina è rara e provoca grave obesità che può essere migliorata mediante somministrazione periferica di leptina ricombinante che porta ad una riduzione dell'appetito (Farooqi IS et al., 1999).

In due soggetti con deficit congenito di leptina, la somministrazione giornaliera sottocutanea di leptina riduceva il livello di ossigenazione sanguigna rilevato con risonanza magnetica funzionale (fMRI) nel nucleo accumbens, caudato, putamen e globo pallido a seguito dell'esposizione di immagini raffiguranti cibo rispetto ad immagini di non-cibo (Farooqi IS et al., 2007). Queste evidenze sono state di recente estese a soggetti sani, in cui si è riscontrata una correlazione positiva tra le concentrazioni plasmatiche di leptina e il segnale fMRI nelle regioni ventrali striatali durante la presentazione di stimoli visivi legati al cibo (Grosshans M et al., 2012). Infatti i recettori della leptina sono presenti nel VTA, incluse le cellule dopaminergiche, dove l'iniezione diretta di leptina è in grado di sopprimere l'assunzione di cibo. Allo stesso tempo, la leptina inibisce il rilascio dopaminergico dal nucleo accumbens e l'attività elettrica dei neuroni

dopaminergici del VTA (Figlewicz DP et al., 2003; Hommel JD et al., 2006; Krugel U et al., 2003). Inoltre è stato dimostrato che una sottopopolazione dei neuroni VTA leptino-responsivi proiettano a livello del nucleo dell'amigdala (Leshan RL et al., 2010), un'area fortemente coinvolta nei processi di dipendenza. Di conseguenza, sebbene inizialmente si pensasse che la leptina interagisse solamente con i neuroni ipotalamici per regolare l'assunzione di cibo, gli ultimi studi aprono la possibilità che i livelli circolanti di leptina possano modulare allo stesso tempo anche le più alte funzioni corticali.

## **Adiponectina**

Adiponectina è una proteina secreta dal tessuto adiposo che possiede un ruolo chiave nella regolazione della responsività di fegato e muscolo all'insulina. Essa, infatti, aumenta la sensibilità all'insulina. In patologie quali diabete di tipo 2 e obesità è ridotta, facilitando così l'insorgere di insulino-resistenza. Inoltre livelli di adiponectina sono *down* regolati anche in condizioni metaboliche avverse, come una distribuzione sfavorevole e disfunzione del tessuto adiposo, che caratterizzano la condizione di obesità (Turer AT et al., 2012). Di conseguenza i livelli circolanti di adiponectina sono inversamente correlati con il peso corporeo e in particolar modo con la massa di tessuto grasso viscerale (Kishida K et al., 2014).

## **Insulina**

L'insulina è un ormone peptidico formato da 2 catene (catena A di 21 aminoacidi e catena B di 30 aminoacidi) unite da 2 ponti disolfuro, prodotto dalle cellule beta delle isole di Langerhans all'interno del pancreas ed è stato il primo segnale di adiposità a essere descritto (Schwartz MW et al., 1992).

L'insulina aumenta in risposta ad un carico di glucosio e, come per la leptina, i livelli circolanti riflettono la massa grassa. L'insulina attraversa la barriera ematoencefalica tramite trasporto mediato da recettore. Recettori dell'insulina sono ampiamente distribuiti nel cervello, in particolare nei nuclei ipotalamici coinvolti nella regolazione dell'assunzione di cibo. L'insulina ha un effetto anoressizzante quando somministrata icv o direttamente nel VMN, effetto che è invertito da anticorpi anti-insulina (McGowan MK et al., 1992). Il meccanismo

preciso tramite il quale l'insulina inibisce l'assunzione di cibo non è ancora chiaro ma la somministrazione d'insulina nel terzo ventricolo di ratti a digiuno aumenta l'espressione di mRNA nel POMC del ARC e riduce l'assunzione di cibo. Questo effetto anoressigenico dell'insulina è bloccato dagli antagonisti melanocortinici (Benoit SC et al., 2002).

Inoltre, Figlewicz DP et al. (2009) hanno dimostrato l'importanza dell'insulina all'interno del sistema ricompensa, che andrebbe ad agire a livello del VTA, in maniera analoga alla leptina. Questa evidenza potrebbe indicare che la leptina e l'insulina potenziano l'uno l'effetto dell'altro a livello del VTA, così come precedentemente dimostrato per ARC (Morton GJ et al., 2005). Sfortunatamente è stata mostrata nei ratti, che l'insulino resistenza associata all'obesità riduce la capacità dei circuiti ricompensa di rispondere all'insulina (Figlewicz DP et al., 2006).

## **SEGNALI PERIFERICI PROVENENTI DAL TRATTO GASTROINTESTINALE**

Il tratto gastrointestinale comunica intensamente in maniera reciproca con il cervello attraverso il nervo vago, il sistema nervoso simpatico e gli ormoni secreti dal tratto gastrointestinale stesso.

### **Ghrelina**

La ghrelina è un peptide oressigenico, prodotto principalmente dalle cellule ointiche dello stomaco, che rappresenta un ligando naturale dei recettori ipotalamo-ipofisari GH secretagoghi (GHS-R), attraverso l'attivazione dei quali è in grado di determinare uno spiccato effetto stimolante sulla secrezione di GH sia in vitro sia in vivo.

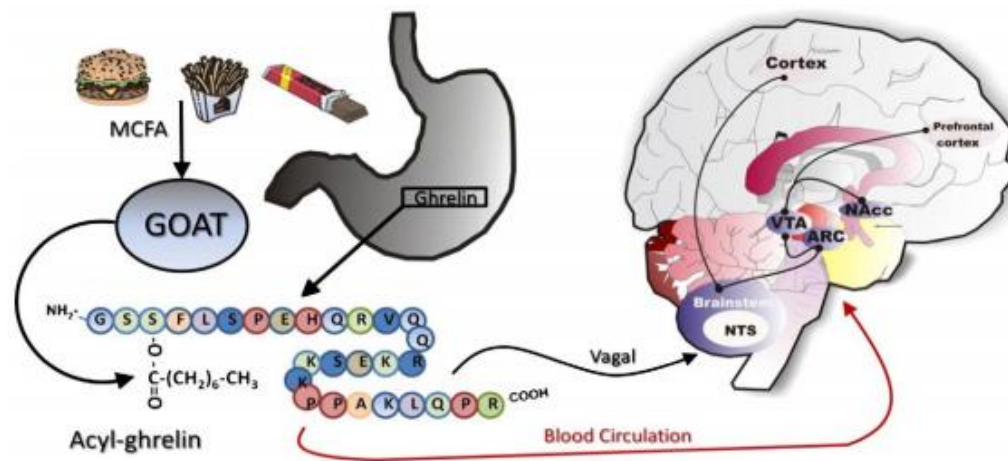
La ghrelina viene generata dal clivaggio proteolitico del precursore pre-proghrelina di 117 aa codificato dal gene GHRL. Il clivaggio del peptide terminale N-terminale di 23 aa fornisce il peptide proghrelina di 94 aa, che dopo un ulteriore clivaggio determina l'aumento di ghrelina e di obestatina. Obestatina, un peptide ormonale originariamente isolato dallo stomaco di ratto (Zhang JV et al., 2005), non lega il recettore ghrelinico e possiede una controversa attività biologica (Gargantini E et al., 2013). Il gruppo ossidrilico sul residuo Ser 3 della proghrelina

viene acilato, generalmente con acido ottanoico, attraverso un unico evento post-traslazionale catalizzato dalla ghrelina O-aciltransferasi (GOAT) (Yang J et al., 2008;). Il recettore ghrelinico a 7 domini transmembrana (GHS-R1a) rappresenta una delle due varianti prodotte *splicing* genetico di GHSR (dove l'altra variante è costituita da GHSR1b), mentre ghrelina non sembrerebbe legare o attivare l'isoforma a 5 domini transmembrana GHS-R1b, il cui ruolo funzionale rimane ancora da chiarire (Howard AD et al., 1996).

La forma desacilata della ghrelina (UAG), invece non va a legare o ad attivare il recettore ghrelinico, nonostante abbia concentrazioni plasmatiche più elevate rispetto a ghrelina (Liu, J et al., 2008). Diversi dati emergenti suggeriscono che UAG potrebbe avere diverse funzioni biologiche significative, inclusi gli effetti benefici sulla secrezione insulinica e sulla lipolisi (Ozcan B et al., 2014; Benso A et al., 2012), e che potrebbe agire come un antagonista endogeno di ghrelina (Delhanty PJ et al., 2012).

A livello dei neuroni NPY e GHRH dell'ipotalamo, sono localizzati sottotipi recettoriali GSH-R1a (Lucidi P et al., 2004). Nell'uomo l'infusione endovenosa di ghrelina a dosi fisiologiche stimola la fame e promuove l'assunzione di cibo a breve termine (Wren AM et al., 2001). L'impiego di antagonisti per GHS-R1a potrebbe costituire un potenziale approccio per limitare l'assunzione di cibo e la massa grassa, anche se la somministrazione di BIM-28163 (antagonista GHS-R1) nei roditori ha portato un paradossale aumento di peso (Halem HA et al., 2005). Inoltre, anche se la ghrelina determina una potente stimolazione dell'appetito, i topi ghrelino-privi mostrano avere appetito e peso corporeo normale quando nutriti con una dieta standard e comunque non resistono all'obesità indotta dalla dieta (Sun Y et al., 2003). Ciò può essere dovuto a up-regolazione di sistemi alternativi che controllano l'appetito, o forse la ghrelina ha solo effetti a breve termine sull'assunzione di cibo, giocando un ruolo minore nella regolazione complessiva di appetito. Inoltre, GHS-R1a è espresso anche a livello delle aree nel sistema ricompensa, come VTA e LDTg (Guan XM et al., 1997; Zigman JM et al., 2006). E' stato dimostrato che la somministrazione centrale, intra-VTA o intra-LDTg di ghrelina aumenta il rilascio dopaminergico a livello del nucleo accumbens e l'attività locomotoria, effetto che viene abolito bloccando i recettori colinergici (Jerlhag E et al., 2007; Jerlhag E et al., 2006). Queste evidenze documentano la rilevanza diretta di ghrelina sul sistema ricompensa

coinvolto con l'assunzione di sostanze d'abuso (Jerlhag E et al., 2009; Jerlhag E et al., 2010), e allo stesso modo di cibo palatabile (Egecioglu E et al., 2010; Perello M et al., 2010). L'iniezione icv di ghrelina stimola l'assunzione di cibo (Naleid AM et al., 2005), specialmente l'apporto di cibo palatabile (Egecioglu E et al., 2010). Infatti l'impiego periferico di antagonisti GHS-R1a riduce la preferenza di consumo verso il cibo palatabile e sopprime il comportamento motivazionale verso i cibi ricompensa sia dolci (Skibicka KP et al., 2012) che grassi (Perello M et al., 2010). Complessivamente queste evidenze supportano il ruolo fisiologico di ghrelina nell'aumentare e incentivare la motivazione per ricompense naturali, come il cibo.



**Fig. 4:** Schema dell'attivazione oressigenica di ghrelina e signalling.

### **Colecistochinina (CCK)**

La colecistochinina è stata il primo ormone intestinale (composto da 33 aminoacidi) illustrato come avente un effetto sul consumo di cibo. CCK è rilasciata dopo il pasto e, in aggiunta agli effetti locali all'interno dell'intestino, inibisce l'assunzione di cibo nei roditori e nell'uomo (Gibbs J et al., 1973; Kissileff HR et al., 1982). Ratti knockout per il recettore CCK<sub>A</sub> e la somministrazione intraperitoneale di antagonisti CCK<sub>A</sub> sviluppano obesità, in parte a causa d'iperfagia (Silver AJ et al., 1989). La CCK inoltre stimola la liberazione del peptide YY (PYY) dalla porzione distale del tratto gastrointestinale (Lin HC et al., 2000). Si ritiene che gli effetti anoressizzanti di somministrazioni periferiche di CCK siano mediati dai recettori CCK1 sulle fibre afferenti vagali che trasmettono

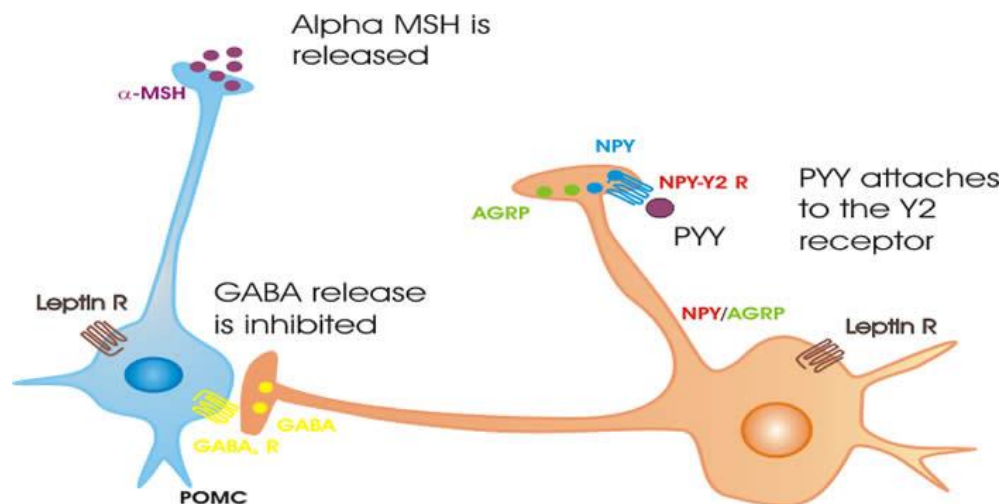
al tronco encefalico. La somministrazione diretta di CCK nel DMN riduce l'assunzione di cibo e down-regola l'espressione del gene NPY (Chen J et al., 2008). CCK è espressa anche a livello di una popolazione di neuroni dopaminergici mesolimbici (Hökfelt et al., 1980; Hommer et al., 1986) che proiettano a livello della corteccia frontale, amigdala, striato e NAc (Hökfelt et al., 1980). CCK promuove l'attivazione dopaminergica neuronale in vitro (Brodie et al., 1987) e in vivo (Yim et al., 1991) attraverso l'interazione con CCK1.

## **PYY**

PYY è stato isolato per la prima volta nel 1980 dalla mucosa intestinale porcina e così chiamato per la presenza di un residuo tirosinico (l'abbreviazione dell'aminoacido è Y) sia nella porzione C-terminale che nella N-terminale del polipeptide. PYY appartiene alla famiglia dei polipeptidi pancreatici PP-fold, comprendente NPY e polipeptide pancreatico (PP). Tutti presentano significative omologie di sequenza e contengono molteplici residui tirosinici (Conlon JM, 2002). PYY esiste in due forme principali: PYY1-36 e PYY3-36. PYY1-36 è costituito da 36 aminoacidi ed è secreto principalmente dalla porzione distale dell'intestino, in particolare da cellule endocrine specializzate, chiamate cellule L, nell'ileo, colon e retto (Adrian TE et al., 1985a, Ekblad E et al., 2002). Le cellule L dell'intestino liberano PYY in proporzione alla quantità di calorie introdotte col pasto. A digiuno i livelli di PYY3-36 circolante sono bassi; dopo assunzione di cibo, crescono rapidamente dopo 15 min, raggiungendo plateau dopo 1-2 ore e rimangono elevati fino a 6 ore (Adrian TE et al., 1985a). La liberazione di PYY si verifica, ad ogni modo, prima che i nutrienti raggiungano le cellule del tratto intestinale distale quindi il rilascio potrebbe essere mediato da un riflesso neuronale, così come da un contatto diretto con i nutrienti (Fu-Cheng X et al., 1997). I livelli di PYY sono influenzati anche dalla composizione del pasto: i lipidi sono potenti stimolatori della secrezione a differenza di carboidrati o proteine (Lin HC et al., 2003). PYY1-36 subisce, dopo la secrezione, clivaggio degli aminoacidi tirosina e prolina dalla porzione N-terminale da parte di un enzima, ubiquitariamente espresso, la di-peptidil peptidasi IV (DPP-IV), producendo PYY3-36, la forma prevalentemente circolante (Neary MT et al., 2009). PYY3-36 è un segnale anoressizzante. La somministrazione periferica di PYY3-36 nel roditore inibisce l'assunzione di cibo e riduce il peso corporeo

(Batterham RL et al., 2002); in modelli animali di diabete, PYY è in grado di migliorare anche il controllo glicemico (Pittner RA et al. 2004). La somministrazione endovenosa di PYY3-36 a individui normopeso ha potenti effetti sull'appetito, causando una riduzione del 30% dell'assunzione di cibo (Batterham RL et al., 2002, 2003b). La riduzione delle calorie introdotte è accompagnata dalla diminuzione del senso di fame, senza alterazione dello svuotamento gastrico. Questo effetto persiste fino a 12 ore dopo il termine dell'infusione, nonostante i livelli di PYY3-36 circolante tornino a valori basali (Batterham RL et al., 2002). PYY3-36 rappresenta, quindi, un importante segnale fisiologico di sazietà postprandiale.

I peptidi PP-fold si legano a recettori a sette domini transmembrana, accoppiati a proteine G, denominati Y1-Y2-Y4-Y5-Y6 (Larhammar D, 1996). I recettori differiscono nella loro distribuzione e sono classificati in funzione dell'affinità per PYY, PP e NPY. Sebbene NPY e PYY leghino con alta affinità tutti i recettori Y, PYY3-36 ha affinità elevata per Y2 e ridotta per Y1 e Y5. Poiché PYY attraversa liberamente la barriera ematoencefalica, si ritiene che l'effetto sull'appetito di PYY3-36 periferico possa essere mediato dal recettore Y2 del nucleo arcuato, un recettore presinaptico inibitorio espresso sui neuroni NPYergici (Nonaka N et al., 2003;). Studi elettrofisiologici hanno dimostrato che la somministrazione di PYY3-36 inibisce i neuroni NPYergici, inoltre l'espressione dell'mRNA di NPY risulta ridotta dopo somministrazione periferica di PYY3-36 (Batterham RL et al., 2002). Il ruolo chiave di Y2 è stato dimostrato da Batterham et al. (2002) attraverso l'evidenza sperimentale che topi con una delezione su Y2 erano resistenti all'effetto anoressigenico di PYY3-36. Y2 è stato trovato anche a livello del sistema nervoso centrale, nel ganglio nodoso e nelle afferenze vagali, per cui esercita anche a questi livelli i suoi effetti sul peso corporeo. Inoltre gli stessi autori hanno generato un topo knock-out per PYY che, sottoposto a dieta libera, mangiava molto di più rispetto ai controlli, sviluppando un aumento marcato di adiposità sottocutanea e viscerale, reversibile con somministrazione esogena di PYY3-36.



**Fig. 5:** Schema del meccanismo d'azione di PYY sui neuroni NPYergici che determina l'attivazione dei neuroni POMC.

L'effetto di PYY3-36 sull'assunzione di cibo non si esercita solo sul ARC; nel 2007 Batterham RL et al., mediante tecniche di RMN, hanno scoperto che i suoi effetti sull'appetito sono mediati anche da altre regioni cerebrali oltre che dalle aree che controllano l'omeostasi energetica: le regioni corticolimbiche, la corteccia orbitale frontale, lo striato ventrale, il cingolo anteriore, l'insula e VTA. Ad alte concentrazioni di PYY3-36, dunque in fase postprandiale, sono queste aree, coinvolte nei processi di ricompensa e nel comportamento edonistico, a regolare il comportamento alimentare, mentre a bassi livelli di PYY3-36 la regolazione è prevalentemente ipotalamica. La somministrazione periferica di PYY3-36 riduce i livelli di ghrelina e questa azione può contribuire ai suoi effetti sull'appetito (Batterham RL et al. 2003b). In contrasto con l'azione periferica di PYY3-36, l'azione centrale di PYY1-36 e PYY3-36 è oressigenica. La somministrazione di PYY nel terzo e nel quarto ventricolo cerebrale, nel ventricolo laterale, nel nucleo paraventricolare o nell'ippocampo, stimola potentemente l'assunzione di cibo nei roditori. Questo effetto oressigenico è ridotto sia in topi knockout per il recettore Y1 che Y5 (Hagan MM et al., 1998; Kanatani A et al., 2000). Quindi, questi recettori a bassa affinità possono mediare gli effetti centrali sul cibo di PYY3-36, mentre PYY3-36 periferico è capace di interagire con i recettori ad alta affinità Y2 del nucleo arcuato (Batterham RL et al. 2002).

La liberazione di PYY è stimolata dalla CCK (Lin HC et al., 2000), dall'esercizio fisico a lungo termine (Jones TE et al., 2009), dai nutrienti assunti durante il pasto e dagli acidi biliari (Roberts EM et al., 2011). Allo stesso tempo il rilascio di PYY può essere inibito da altri ormoni gastrointestinali come la somatostatina e il GLP-1.



### **Prodotti del proglucagone: GLP-1, GLP-2 e ossintomodulina**

Il proglucagone viene scisso enzimaticamente liberando differenti prodotti, a seconda del tessuto. Nel pancreas, il glucagone è il prodotto principale, mentre nel cervello e nell'intestino, i peptidi glucagone-simili 1 e 2 (GLP-1, GLP-2) e l'ossintomodulina (OXM) sono i principali prodotti.

OXM è rilasciata dalle cellule L del piccolo intestino in proporzione ai nutrienti ingeriti. Un'infusione di OXM a individui normopeso, riduce il senso di fame e l'assunzione di calorie, fino a 12 ore dal termine dell'infusione (Cohen MA et al., 2003). La somministrazione periferica di OXM riduce i livelli circolanti di ghrelina sia nei roditori che nell'uomo (Dakin CL et al., 2002; Cohen MA et al., 2003).

GLP-1 è rilasciato in circolo dopo l'assunzione di cibo dalle cellule L del piccolo intestino, in proporzione alle calorie ingerite. È stato dimostrato che GLP-1 mostra una risposta bifasica dopo un pasto. Come PYY, il primo picco avviene prima che i nutrienti entrino nell'intestino distale (Delzenne N et al., 2010). Inoltre è stato dimostrato, che la concentrazione di GLP-1 aumenta dopo un pasto ad alto contenuto di carboidrati (Smeets AJ et al., 2008). Questo effetto è presumibilmente dovuto al fatto che i carboidrati vengano assorbiti nel tratto prossimale dell'intestino. Invece, il secondo picco di secrezione di GLP-1 potrebbe essere innescato dall'assorbimento nel lume intestinale degli acidi grassi liberi, attraverso l'attivazione dei recettori GPR40 (Edfalk S et al., 2008), GPR119 (Lauffer LM et al., 2009) e GPR120 (Hirasawa A et al., 2005) accoppiati alle G proteine.

Le due forme sintetizzate sono GLP-1<sub>1-37</sub> e GLP-1<sub>1-36</sub> ammide. Un ulteriore clivaggio produce i frammenti GLP-1<sub>7-37</sub> e GLP-1<sub>7-36</sub> ammide. La specie bioattiva di GLP-1 maggiormente in circolazione è GLP-1<sub>7-36</sub> ammide (Orskov C et al., 1994). GLP-1<sub>7-36</sub> ammide è degradato rapidamente dall'enzima DPP-IV ed ha un'emivita di 2 minuti (Kieffer TJ et al. 1995). GLP-1 agisce legandosi ai recettori GLP-1 (GLP-1R) accoppiati a G proteine. GLP-1<sub>7-37</sub> e GLP-1<sub>7-36</sub> ammide hanno uguale affinità per GLP-1R (Thorens B et al., 1993). GLP-1R è espresso dalle isole pancreatiche, dove GLP-1 agisce come ormone incretinico. Questo permette un maggiore rilascio glucosio-dipendente di insulina dopo i pasti (Kreymann B et al., 1987). GLP-1 inibisce anche la secrezione del glucagone e

ritarda lo svuotamento gastrico (Willms B et al., 1996). GLP-1R è presente anche in alcune aree del SNC implicate nel controllo dell'appetito, tra cui il ARC e il PVN nell'ipotalamo e l'area postrema del tronco cerebrale (Wei Y et al., 1995; Shughrue PJ et al., 1996). Neuroni contenenti GLP-1 si trovano anche nel tratto del nucleo solitario. Inoltre, ci sono proiezioni all'ipotalamo dorso mediale (Larsen PJ et al., 1997).

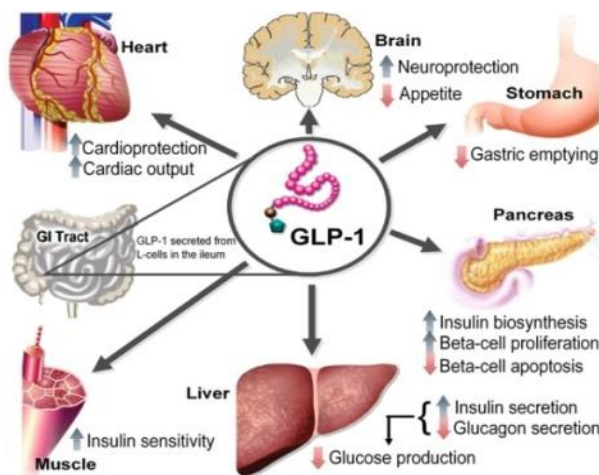
È ben noto che la somministrazione di GLP-1<sub>7-36</sub> ammidide perifericamente o centralmente determini una ridotta assunzione di cibo nei roditori, mentre la co-somministrazione di un antagonista di GLP-1 (exedina<sub>9-39</sub>) abolisce questo effetto (Turton MD et al., 1996). Nello stesso studio, la singola somministrazione di exedina<sub>9-39</sub> raddoppia l'assunzione di cibo in ratti sazi oltre a potenziare la risposta derivata dalla somministrazione NPY, suggerendo che GLP-1 regola l'appetito fisiologicamente.

Una serie di studi hanno dimostrato che la somministrazione periferica di GLP-1<sub>7-36</sub> ammidide negli esseri umani porta a una riduzione dose-dipendente dell'appetito e dell'apporto energetico *ad libitum*. Una meta-analisi di importanti studi condotti da Verdich (Verdich C et al., 2001) ha rivelato che l'infusione endovenosa di GLP-1<sub>7-36</sub> ammidide riduce l'apporto energetico dose-dipendente sia in soggetti normopeso che in sovrappeso. È risultato che nei soggetti magri, l'infusione di GLP-1 ha portato a una riduzione del 13,2% dell'apporto energetico al pasto *ad libitum* rispetto all'infusione di soluzione fisiologica. La riduzione dell'apporto di energia *ad libitum* per i soggetti in sovrappeso/obesi da parte di GLP-1<sub>7-36</sub> ammidide era paragonabile (10,5%) a quella dei soggetti magri (Verdich C et al., 2001). Si è riscontrato, inoltre, che a seguito di quotidiane iniezioni sottocutanee di GLP-1<sub>7-36</sub> ammidide (76 nmol 4 volte al giorno) in soggetti umani obesi dopo 5 giorni hanno portato ad una riduzione media del 15% dell'apporto energetico ad ogni pasto rispetto al placebo. Dopo 5 giorni, questo viene tradotto in una perdita di peso in media di 0,55 kg (Näslund E et al., 2004). Si considera che il tronco cerebrale sia un importante sito di azione di GLP-1 periferico, infatti una vagotomia o lesioni delle proiezioni che vanno dal tronco cerebrale all'ipotalamo riducono la soppressione dell'appetito mediata dai livelli circolanti di GLP-1<sub>7-36</sub> ammidide (Abbott CR et al., 2005).

In uno studio condotto sugli esseri umani con l'utilizzo della tomografia ad emissione di positroni (PET) è emerso che la risposta postprandiale di GLP-1 è

positivamente associata a variazioni dell'attività neuronale nella corteccia prefrontale e nell'ipotalamo (Pannacciulli N et al., 2007). Pertanto, come sembra essere anche per il PYY3-36, GLP-1<sub>7-36</sub> ammido periferico può agire sia attraverso il nervo vago, con proiezioni al tronco encefalico e successivamente all'ipotalamo, oppure, direttamente sul tronco cerebrale (accedendo attraverso l'area postrema) o sull'ipotalamo (accedendovi attraverso il torrente circolatorio che dell'eminenza mediana). Infine, è probabile che GLP-1 abbia una funzione anche nelle regioni cerebrali coinvolte nella "funzione ricompensa" (come la corteccia prefrontale), sia direttamente sia attraverso vie dei centri omeostatici.

Il GLP-2 produce un elevato numero di effetti a livello dell'intestino: stimolazione della crescita della mucosa del piccolo e grande intestino; inibizione del processo di apoptosi degli enterociti e delle cellule delle cripte; stimolazione del trasporto di glucosio negli enterociti e dell'espressione di GLUT-2; inibizione dello svuotamento gastrico e della secrezione acida gastrica; rilassamento della muscolatura liscia intestinale (Dubè PE et al., 2006). Come per GLP-1, GLP-2 influenza anche l'assunzione di cibo agendo su omonimi recettori (GLP-2R), situati in diverse aree del SNC, con prevalenza nel nucleo dorso mediale ipotalamico. Dati interessanti dimostrano come la somministrazione icv di GLP-2 nei ratti e nei topi, inibiva l'assunzione di cibo e che tale effetto non veniva bloccato da exedina<sub>9-39</sub>, suggerendo che GLP-1R non è essenziale per la trasduzione del segnale anoressigenico di GLP-2 (Tang-Christensen et al., 2000; Lovshin J et al., 2001).



**Fig. 6. Fisiologia della secrezione di GLP-1 e azione GLP-1 in diversi organi e tessuti.** GLP-1 viene prodotto dopo i pasti dalle cellule L. Attraverso l'attivazione dei recettori dell'insulina sulle cellule  $\beta$ , GLP-1 (come GIP) stimola la biosintesi e la secrezione di insulina e inibisce la secrezione di glucagone nel pancreas, che a sua volta riduce la gluconeogenesi epatica. Il rilascio di GLP-1 esercita anche effetti protettivi sul cuore e sul cervello.

## **OBESITÀ**

L'obesità è una malattia cronica a eziologia multifattoriale, caratterizzata da un'alterazione del bilancio energetico e da accumulo eccessivo di tessuto adiposo nell'organismo. Di conseguenza un elevato introito energetico in combinazione con un ridotto livello di attività fisica potrebbe costituire una delle possibili cause dell'obesità. Attribuirne però la causa solo a questi fattori sarebbe un'eccessiva semplificazione, dato che anche i fattori genetici giocano un ruolo dominante nel determinare il peso corporeo in un dato ambiente. Infatti, il BMI di bambini adottati è linearmente correlato a quello di entrambi i genitori biologici, anche quando non vi sia un diretto contatto con essi, e non è correlato con quello di entrambi i genitori adottivi, anche se questi provvedono al menù giornaliero (Stunkard AJ et al., 1986).

La genesi e lo sviluppo dell'obesità sono sempre accompagnate da cause psicologiche. Il soggetto obeso è incline a sviluppare una dipendenza da cibo, difficile da contrastare perché egli non può astenersi dall'assunzione della sostanza incriminata, e non esiste alcuna difficoltà nell'approvvigionamento di tale sostanza.

Attualmente più di 2 milioni di adulti e bambini in tutto il mondo sono sovrappeso o obesi (Popkin BM et al., 2012). In USA, più del 68% della popolazione è sovrappeso; tra questi soggetti almeno la metà è obesa (Ogden CL et al., 2012). Le previsioni indicano che l'incidenza è destinata ad aumentare nel futuro, fino a raggiungere una condizione di sovrappeso o obesità nel 74% della popolazione USA nel 2020 (Wang YC et al., 2011).

### **Classificazione**

In clinica, per classificare l'obesità, si utilizza l'indice di massa corporea (*Body mass index*:  $BMI = \text{peso corporeo (Kg)} / \text{altezza (m)}^2$ ). Il BMI è una misura robusta ma indiretta di grasso corporeo che fornisce risultati più affidabili della stima del "peso ideale". Eccezioni all'affidabilità del BMI si trovano in persone con età avanzata, in soggetti molto muscolosi, e in individui dotati di un'elevata altezza.

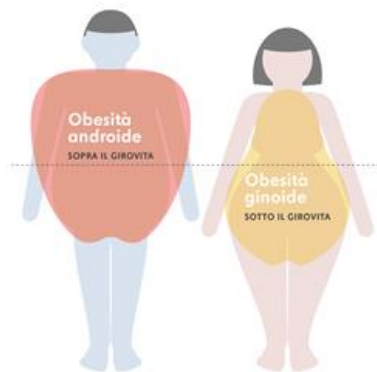
L'OMS ha fissato i criteri che permettono di classificare l'obesità in base al BMI:

- BMI compreso tra 18.5 e 24.9 indica, è stato definito rappresentativo di individuo normopeso.

- BMI > 25, determina sovrappeso o preobesità.
- BMI > 30 è associate ad obesità vera e propria e in particolare sono state distinte:
  - Obesità di grado I quando BMI è compreso fra 30 e 34,9.
  - Obesità di grado II quando BMI è compreso fra 35 e 39,9.
  - Obesità di grado III quando BMI > 40

BMI non è una stima accurata del contenuto di grasso corporeo, infatti questo non è determinante ai fini di una diagnosi di obesità; esso ha come scopo quello di determinare con relativa certezza, che un soggetto con elevato BMI sia realmente relativamente grasso (Reilly JJ, 2005).

Oltre al grado di sovrappeso/obesità, valutato con il BMI, è clinicamente importante studiare anche la distribuzione del grasso corporeo nell'organismo, perché questa si accompagna a un differente rischio di morbilità e mortalità. Distinguiamo, infatti, un'obesità addominale o viscerale, tipicamente androide, e un'obesità gluteo-femorale o ginoide.



**Fig. 7:** Obesità addominale (sx) e obesità gluteo-femorale (dx).

I pazienti con obesità addominale hanno un rischio aumentato di sviluppare malattie cardiovascolari, diabete, ipertensione e alcune forme di cancro. Questo è dovuto alla più facile mobilizzazione degli acidi grassi degli adipociti viscerali, con aumento del flusso dei lipidi a livello epatico e le conseguenti influenze negative sul metabolismo. Un metodo semplice per valutare clinicamente la quantità di grasso addominale è la misura della circonferenza della vita o il rapporto tra circonferenza della vita e dei fianchi. Nel 1998, il National Institute of Health (NIH) ha classificato il rischio legato all'obesità sia sulla base del BMI sia della circonferenza vita. Secondo questi criteri, anche il semplice sovrappeso (BMI tra 25 e 30 Kg/m<sup>2</sup>) o l'obesità moderata (BMI tra

30 e 35 Kg/m<sup>2</sup>) possono costituire condizioni con rischio elevato di mobilità e mortalità in presenza di un'obesità centrale (circonferenza vita =102 cm negli uomini e =88 cm nelle donne) specie se accompagnata da altre complicanze (ipertensione, diabete, fumo, iperlipemia).

In base alla caratterizzazione genetica, l'obesità si può distinguere in poligenica (la grande maggioranza dei pazienti obesi), monogenica o sindromica:

- **Obesità monogenica:** dovuta a mutazioni di geni di singoli fattori ormonali. Ad oggi la più diffusa forma di obesità monogenica è legata a MC4R e rappresenta il 4% delle obesità nel bambino.
- **Obesità sindromica:** ci sono circa 20 o 30 casi di disordini a trasmissione mendeliana in cui i pazienti sono clinicamente obesi, ma presentano anche ritardo mentale e anomalie nello sviluppo. Queste sindromi derivano da difetti genetici o anomalie cromosomiche e possono essere autosomiche o X-linked (sindrome di Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alstrom).
- **Obesità poligenica o comune:** insorge quando il corredo genetico di un individuo è suscettibile a un ambiente che promuove l'apporto energetico a discapito della spesa energetica.

In base alle caratteristiche del tessuto adiposo, distinguiamo l'obesità in:

- **Ipertrofica:** caratterizzata dall'aumento di volume degli adipociti.
- **Iperplastica:** caratterizzata dall'aumento di numero degli adipociti.
- **Forme miste:** caratterizzate da aumento di volume e di numero degli adipociti.

Il numero degli adipociti può aumentare di due o tre volte e la loro dimensione valutata in contenuto di trigliceridi (TG) può variare anche di 5-8 volte.

L'obesità iperplastica, più frequente nell'età infantile e adolescenziale, è probabilmente più difficile da correggere rispetto a quella ipertrofica.

Sulla base eziologica infine distinguiamo un'obesità primaria o essenziale (la gran parte dei pazienti obesi) e un'obesità secondaria. Le forme secondarie, nelle quali l'obesità è uno dei componenti di specifiche sindromi dovute ad altri fattori, sono principalmente associate a patologie endocrine come: Sindrome di Cushing, ipotiroidismo, insulinoma e craniofaringioma.

## **Alterazioni Endocrine**

L'aumento della secrezione d'insulina rappresenta l'alterazione endocrina più caratteristica nell'obesità. Infatti, nei soggetti obesi la secrezione d'insulina nelle 24 ore è tre volte maggiore in confronto ai soggetti magri di controllo (Polonsky KS et al., 1996). Il rilascio di acidi grassi non esterificati (NEFA) dal tessuto adiposo è il fattore più importante che regola la sensibilità all'insulina. Infatti, l'aumento dei livelli di NEFA, che si verifica sia nell'obesità sia nel DT2, è associato all'insulino-resistenza (Kahn SE et al., 2006).

Le forme più comuni di obesità sono caratterizzate da elevati livelli circolanti di leptina. Infatti, la secrezione di leptina per grammo di tessuto adiposo è due volte maggiore nei soggetti obesi rispetto ai soggetti normopeso. I soggetti obesi sembrano essere resistenti o insensibili alla leptina poiché gli alti di livelli di leptina riscontrati dovrebbero ridurre l'assunzione di cibo e il grasso corporeo. Il meccanismo con cui si sviluppa resistenza alla leptina è tuttora sconosciuto, ma potrebbe derivare da dei difetti nel segnale o nel trasporto della leptina attraverso la barriera ematoencefalica (Kershaw EE et al., 2004).

Generalmente nell'uomo esiste una forte correlazione negativa tra i livelli plasmatici di adiponectina e la massa grassa, fatta eccezione per i casi di grave malnutrizione e i neonati. I livelli di adiponectina sono ridotti nei soggetti obesi, ma aumentano in caso di perdita di peso. Inoltre, è stato dimostrato che l'adiponectina è in grado di migliorare la sensibilità all'insulina nei modelli di obesità genetici o dieta-indotti (Galic S et al., 2010).

Nei soggetti obesi il più evidente cambiamento del sistema ipotalamicoipofisario è correlato all'ormone della crescita (GH). La secrezione di GH risulta essere ridotta nei soggetti obesi e determina un aumento del grasso viscerale, una riduzione della massa magra e della densità minerale ossea. La principale causa della diminuzione della secrezione di GH nell'obeso potrebbe essere costituita da un'alterazione a livello ipotalamico, una disfunzione ipofisaria o da un disturbo sui segnali periferici che agiscono a livello ipofisario o ipotalamico. Per esempio, le alte concentrazioni d'insulina, che troviamo comunemente nell'obeso, determinano inoltre una riduzione nel rilascio di GH (Cordido F et al., 2010).

Allo stesso tempo bisogna tener conto che la ghrelina costituisce il maggior stimolo sulla secrezione di GH e che i livelli plasmatici di ghrelina nell'obeso sono più bassi rispetto a quelli che si riscontrano nei soggetti normopeso (Alvarez-Castro P et al., 2011; Haqq AM et al., 2003).

Nelle donne l'obesità si presenta associata ad una serie di condizioni, come menarca precoce, infertilità e la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), che precedono lo sviluppo di diabete e malattie cardiovascolari (Rachon D et al., 2010). Inoltre la donna obesa presenta frequentemente anomalie riguardanti i livelli plasmatici di steroidi, poiché ha una velocità di secrezione di testosterone, diidrotosterone e androstenedione più elevata rispetto ai soggetti normopeso (Alvarez-Castro-P et al., 2011).

Invece, nell'uomo l'obesità è associata a riduzioni dei livelli totali di testosterone e Sex Hormon Binding Globulin (SHBG), una glicoproteina plasmatica deputata al trasporto degli ormoni sessuali nel sangue (Mah PM et al., 2010). Esiste una correlazione inversamente proporzionale tra i livelli di testosterone totale a livello plasmatico e SHBG con la massa grassa viscerale.

I livelli di cortisolo libero nelle urine sono significativamente più elevati nelle donne con obesità addominale rispetto a donne con obesità periferica o ai controlli, suggerendo così che l'eccessiva produzione di cortisolo possa contribuire allo sviluppo di obesità. Questi risultati evidenziano quindi che le donne con obesità addominale hanno un'iperattività dell'asse adenoipotalamico- ipofisario (HHA) (Pasquali R et al., 1993). L'obesità addominale, infatti, sembra essere caratterizzata da un'aumentata escrezione urinaria di cortisolo libero e da un aumento della velocità di produzione del cortisolo totale (Pasquali R et al., 1999).

I livelli plasmatici di ghrelina sono inversamente correlati al BMI, alla massa di grasso corporeo, ai livelli plasmatici di leptina e ai livelli d'insulina e glucosio (Ukkola O, 2003). In soggetti obesi sono stati riscontrati livelli più bassi di ghrelina che possono poi aumentare a seguito della perdita di peso raggiunta sia solo con la dieta che con la combinazione di dieta e esercizio fisico (Hansen TK et al., 2002).

Inizialmente, Batterham RL et al., avevano riscontrato che i livelli circolanti di PYY erano ridotti nei soggetti obesi (Batterham RL et al., 2003b). Nonostante



si pensasse che il PYY potesse essere coinvolto nello sviluppo dell'obesità, questo non venne poi confermato, dato che i livelli di PYY erano ridotti nei modelli di ratti in cui veniva indotta l'obesità con la dieta (le Roux CW et al., 2006). Infatti, sulla base di alcuni studi clinici, il PYY non sembra un valido farmaco antiobesità. La somministrazione subcutanea di PYY3-36, a una dose ben tollerata, non riduce in modo marcato il consumo di cibo. La somministrazione intranasale di PYY3-36 per due settimane non promuoveva la perdita di peso, mentre dosi più alte di PYY, che determinavano un ridotto consumo di cibo, causavano nausea (Gantz I et al., 2007).

Sebbene i soggetti obesi abbiano generalmente una funzionalità tiroidea normale, l'ormone tireostimolante (TSH) e BMI risultano essere correlati positivamente. Una disfunzione neuroendocrina "primaria" potrebbe rappresentare la ragione degli elevati livelli di TSH nell'obeso. In particolare, è stato dimostrato che la leptina può alterare l'asse tiroideo (Mantzoros CS et al., 2001). Allo stesso tempo, gli aumentati livelli di TSH potrebbero suggerire una resistenza ormonale. Un moderato aumento dei livelli di TSH nell'obeso è associato a normali concentrazioni di T4 e aumentate concentrazioni di T3 così come un aumentato volume tiroideo (Reinehr T, 2010). Le vie fisiologiche che collegano l'obesità con l'aumento degli ormoni tiroidei rimangono comunque ancora da chiarire.

### **Approcci terapeutici nell'obesità**

Una riduzione del 5-10% del peso corporeo in soggetti sovrappeso e obesi è associata a una riduzione del rischio cardiovascolare e dell'incidenza di diabete di tipo II, e a una riduzione della mortalità. Il principale trattamento dell'obesità consiste in una restrizione degli introiti alimentari e in una modificazione dello stile di vita del soggetto; il successo di questi interventi è purtroppo scarso, con un progressivo recupero del peso corporeo nel tempo (Avenell et al., 2004).

La terapia farmacologica è prevista solo per alcune tipologie di pazienti e comprendeva negli anni l'orlistat, la sibutramina e il rimonabant.

Acomplia (principio attivo rimonabant, antagonista del recettore CB1 degli endocannabinoidi) è stato ritirato dal commercio nell'ottobre del 2008 per disposizione dell'AIFA, a seguito dell'elevatissimo rischio di effetti collaterali a livello psichico dovuti alla sua assunzione. Rispetto al placebo, rimonabant

riduceva il peso corporeo in media di 4,6 kg e migliorava il profilo lipidico, aumentando il valore plasmatico delle HDL e riducendo quello dei trigliceridi, ma sembrava non avere effetti sui valori di LDL e sulla pressione arteriosa (Van Gaal et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006).

La sibutramina è stata sospesa in Europa dall'EMA nel gennaio 2010 in seguito ad un aumento delle problematiche cardiovascolari accusate da chi ne faceva uso. La sibutramina, farmaco ad azione centrale, inizialmente era stato sviluppato come antidepressivo; essendo un inibitore del riassorbimento di serotonina e noradrenalina agiva aumentando il senso di sazietà. Il calo ponderale associato all'utilizzo della sibutramina per un anno era del 4,6% e l'efficacia del trattamento era maggiore quando il soggetto modificava il proprio stile di vita e veniva inserito in un programma di controlli regolari. Alla perdita di peso seguiva un aumento dei valori plasmatici delle HDL e una riduzione dei livelli plasmatici dei trigliceridi, senza miglioramento degli altri fattori di rischio (Avenell et al., 2004).

Attualmente quindi l'unico composto disponibile in commercio è l'orlistat. L'orlistat è un inibitore delle lipasi gastriche e pancreatiche che riduce l'assorbimento dei lipidi introdotti con la dieta di circa il 30%. E' un farmaco ad azione non sistemica (solo circa il 3% viene assorbito) che agisce nel tratto gastrointestinale; gli effetti collaterali sono quindi principalmente di tipo gastrointestinale. Le principali reazioni avverse sono lo sgocciolamento oleoso anale, la flatulenza e l'incontinenza fecale; inoltre può essere ridotto l'assorbimento delle vitamine liposolubili, che può essere evitato con l'assunzione di integratori multivitaminici. Tali effetti sembrano essere ben tollerati dai pazienti e diminuiscono se associati ad una dieta a basso contenuto di lipidi. Dalla revisione della letteratura si evince che il trattamento con orlistat per un anno riduce il peso corporeo del 2,9%; inoltre riduce i livelli plasmatici del colesterolo totale e delle LDL, diminuisce la pressione arteriosa e favorisce il controllo della glicemia nei pazienti con diabete di tipo II, mentre nessun miglioramento è stato osservato nei valori plasmatici di HDL e trigliceridi (Padwal et al., 2003). Il calo ponderale che si può ottenere con l'attuale farmaco a disposizione è purtroppo modesto e la sospensione del trattamento farmacologico è spesso associata ad un recupero parziale o totale del peso corporeo iniziale; la ricerca di nuovi composti è quindi fondamentale per

contrastare l'attuale "pandemia dell'obesità". Difatti, attualmente nuovi farmaci che agiscono attraverso le vie del CNS e/o il tessuto adiposo e i segnali del tratto gastrointestinale, sono in fase di studio e di sviluppo clinico (Yanovski SZ et al., 2014).

L'ultima possibilità di intervento è costituita dalla chirurgia bariatrica, che, ad oggi, rappresenta il più efficace trattamento per l'obesità in termini di: perdita di peso, riduzione di comorbidità, e miglioramento della sopravvivenza (Folgueira C et al., 2014; Scholtz S et al., 2014;).

I candidati che vengono sottoposti all'intervento sono pazienti con BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> o con BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> se presentano un alto rischio di comorbidità (patologia cardiopolmonare o TD2) (National Institutes of Health, 1992). I benefici clinici della chirurgia bariatrica nell'ottenere la perdita di peso e il miglioramento delle comorbidità metaboliche sono stati principalmente attribuiti ai cambiamenti delle risposte fisiologiche da parte degli ormoni gastrointestinali e del metabolismo del tessuto adiposo (Miras AD et al., 2013; Ionut V et al., 2013).

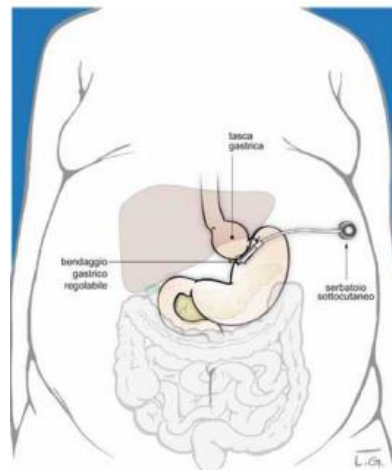
### ***Tecniche di chirurgia bariatrica***

Attualmente, esistono quattro diverse procedure di chirurgia bariatrica: *sleeve gastrectomy* (SG), bypass gastrico Roux-en Y (RYGB), bendaggio gastrico adattabile (AGB), deviazione biliopancreatica (BPD). Quest'ultima rappresenta una procedura di malassorbimento, impiegata in meno del 2% degli interventi (Buchwald et al., 2009; Buchwald et al., 2004). Per tutti gli interventi di chirurgia dell'obesità è stata dimostrata la fattibilità per via laparoscopica e questo approccio dovrebbe essere considerato di prima\_scelta. Dati derivanti da studi prospettici randomizzati hanno dimostrato che l'approccio laparoscopico è vantaggioso rispetto a quello open in termini di miglior decorso postoperatorio e di riduzione delle complicanze (Società Italiana di Chirurgia dell'obesità e delle malattie metaboliche- SICOB 2006).

### ***Bendaggio gastrico***

Il bendaggio gastrico consiste nel posizionamento di una benda dotata di camera pneumatica attorno alla parte superiore dello stomaco, in regione

sottocardiale, creando una tasca gastrica prossimale di dimensioni molto ridotte. Alla camera pneumatica è collegato un tubo in silicone che termina con un serbatoio che viene posizionato a livello sottocutaneo nella parete addominale e che permette la regolazione percutanea del calibro del bendaggio. L'intervento non modifica in modo definitivo l'anatomia dello stomaco ed è quindi completamente reversibile. Il bendaggio gastrico provoca un senso di sazietà precoce che riduce la quantità di cibo introdotto. Le complicanze operatorie gravi sono molto rare (0.2%) e la mortalità operatoria molto bassa (<0.1%). Le principali complicanze postoperatorie specifiche sono rappresentate da migrazione del bendaggio all'interno dello stomaco (<1%), dilatazione della tasca gastrica e scivolamento del bendaggio (3%), deconnessione del port e/o del catetere con perdita di tenuta del sistema (3%).



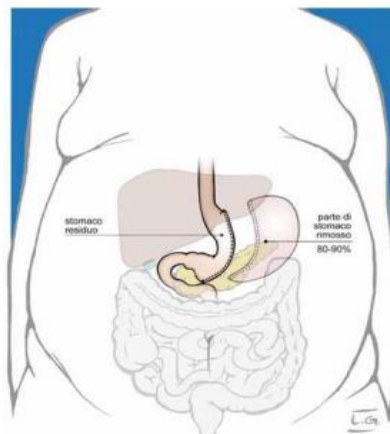
**Fig. 8:** Bendaggio gastrico (SICOB 2006).

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

### Sleeve Gastrectomy

È un intervento almeno parzialmente restrittivo che consiste nella sezione dello stomaco con rimozione di circa i 2/3 di esso. La sezione avviene parallelamente alla piccola curva in modo da creare uno stomaco di forma tubulare. L'intervento mira a ridurre drasticamente la quantità di cibo che può essere ingerita e provoca un senso di sazietà precoce. Tuttavia, la rimozione di una

parte significativa dello stomaco e/o la modificazione della velocità di transito gastrico causano anche modificazioni della secrezione di enteroormoni ad azione di regolazione sul bilancio energetico e sul metabolismo glucidico. L'intervento è stato inizialmente introdotto come preparatorio di interventi successivi più complessi (*duodenal switch*) nei pazienti con gravi problemi cardio-respiratori e con BMI elevati, ma viene oggi proposto anche e prevalentemente come intervento isolato. La mortalità operatoria è circa dello 0.2% ed è specificamente sostenuta dalla creazione di fistole lungo la lunga sutura gastrica. Le principali complicanze postoperatorie specifiche sono rappresentate da dilatazione dello stomaco residuo e reflusso gastro-esofageo. I risultati in termini di calo ponderale sono valutabili intorno al 60% dell'eccesso di peso. Non vi sono ancora risultati a lungo termine, ma è possibile vi sia un significativo numero di casi in cui si verifica ripresa ponderale ed in cui può essere richiesto il completamento dell'intervento mediante una procedura di revisione.



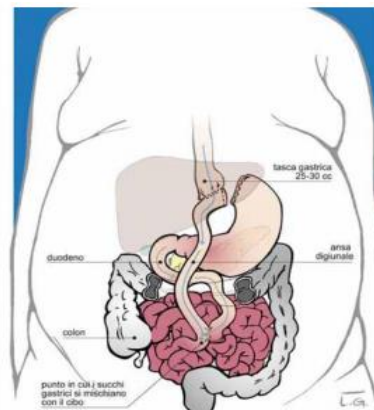
**Fig. 9:** Sleeve gastrectomy (SICOB 2006)

### *Bypass gastrico*

L'intervento consiste nella creazione di una tasca gastrica prossimale di 15-20 cm esclusa dalla restante porzione dello stomaco. A questa neotasca viene collegato il digiuno, andando quindi ad escludere dal transito degli alimenti la restante parte dello stomaco ed il duodeno. Il calo ponderale avviene in parte mediante un meccanismo restrittivo, ma anche a seguito della modificazione della secrezione di entero-ormoni ad azione di regolazione sul bilancio energetico e sul metabolismo glucidico. Può partecipare alla determinazione del calo ponderale la presenza di una *dumping syndrome* a seguito

dell'assunzione bevande e/o cibi dolci. Non vi è un significativo malassorbimento per i macronutrienti (lipidi, glicidi, protidi) ma vi è un certo grado di malassorbimento per alcuni micronutrienti (Ca, Fe e VitB12).

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



**Fig. 10:** Bypass gastrico (SICOB 2006).

### ***Cambiamenti ormonali dopo chirurgia bariatrica***

A seguito dell'intervento di chirurgia bariatrica l'apporto energetico viene ridotto in maniera consistente e questo effetto è duraturo, come indicato dai dati di 20 anni relativi alla perdita di peso di uno Studio Svedese su Soggetti Obesi (Sjostrom, 2013; Sjostrom et al., 2004). I profili ormonali, che coinvolgono in particolar modo gli ormoni gastrointestinali, a seguito dell'intervento di chirurgia bariatrica, sembrerebbero favorire una condizione anoressigenica, migliorando i parametri metabolici e favorendo la riduzione dell'appetito (Inui A et al., 2004).

Per esempio, i livelli circolanti di leptina e insulina, due importanti ormoni che agiscono a livello centrale per influenzare il bilancio energetico a lungo termine, diminuiscono a seguito di qualsiasi tipo di chirurgia bariatrica, stabilendo una solida risposta adattativa alla perdita di peso (Schwartz et al., 2003). L'adiponectina, ormone secreto a livello del tessuto adiposo aumenta in risposta ad una restrizione energetica, perdita di peso e a seguito dell'intervento di chirurgia bariatrica. Diversi studi hanno riportato un aumento dei livelli circolanti a seguito di RYGB (de Carvalho CP et al., 2009; Woelnerhanssen B et al., 2011; Carrasco F et al., 2014).

Diversi studi in cui si sono valutati i livelli circolanti di ghrelina, a seguito di intervento di chirurgia bariatrica hanno mostrato risultati controversi che differivano in base alla procedura chirurgica effettuata. Per quanto riguarda RYGB, si è dimostrato che i livelli di ghrelina possono diminuire, aumentare o non cambiare (Peterli R et al., 2009; Nannipieri M et al., 2013; Terra X et al., 2013; Yousseif A et al., 2014; Lee WJ et al., 2011; Holdstock C et al., 2003). Questi diversi risultati possono essere spiegati dalla grande variabilità, in ciascun caso, legata al tempo in cui è stato effettuato il prelievo, dalla tecnica operatoria impiegata e dal residuo di tasca gastrica. Nonostante, i livelli di ghrelina risultano essere comprensibilmente ridotti del 40-60% a seguito di SG, mediante la rimozione del fondo gastrico, ad oggi, diverse linee di ricerca preclinica e cliniche mostrano dei dubbi riguardo il ruolo di ghrelina nel generare una sostenuta perdita di peso (Anderson et al., 2013; Chambers et al., 2013; McFarlane et al., 2014).

La letteratura riporta dati controversi anche per quanto riguarda i cambiamenti di secrezione di CCK a seguito dell'intervento gastrico. Secondo i primi studi condotti su RYGB non si riscontrava alcun cambiamento nei livelli postprandiali di CCK, dopo un pasto arricchito di grassi e proteine 6 mesi dopo l'intervento (Kellum JM et al 1990). Comunque, più recentemente, sono stati riportati cambiamenti postprandiali dei livelli di CCK a distanza di due settimane dall'intervento (Jacobsen SH et al., 2012). Di conseguenza, questi dati potrebbero suggerire che l'aumento dei livelli postprandiali di CCK potrebbe contribuire ad un senso di sazietà anticipato dopo chirurgia RYGB.

Inoltre, RYGB genera una risposta esagerata postprandiale delle cellule enteroendocrine di tipo L che porta ad un rapido aumento dei livelli di GLP-1,

PYY e OXM (Laferrere et al., 2008). Diversi studi hanno dimostrato che i livelli circolanti di GLP-1 aumentano dopo RYGB, prima che si verificasse la perdita di peso, evento che potrebbe contribuire alla remissione del diabete (Nannipieri M et al., 2013; Korner J et al., 2009; Peterli R et al., 2012; de Carvalho CP et al., 2009; Evans S et al., 2012). Nelle altre procedure di chirurgia bariatrica sono state riportate risposte variabili dei livelli circolanti di GLP-1 (Sweeney TE et al., 2014). In un modello roditore di RYGB gastrico i livelli postprandiali di PYY e GLP-1 aumentavano dopo l'intervento. Invece, la successiva infusione di octreotide o dell'antagonista specifico per GLP-1, exenedina<sub>9-39</sub>, aumentava l'apporto di cibo nei ratti operati di RYGB, ma non in quelli falsamente operati, supportando il ruolo degli ormoni gastrointestinali nel ridurre l'apporto energetico a seguito dell'intervento (Abegg et al., 2013; Fenske et al., 2012).

un rapido miglioramento della condizione di resistenza insulinica è stato dimostrato per tutti gli interventi di chirurgia bariatrica. Per quanto riguarda SG, alcuni studi hanno dimostrato un'alta percentuale di risoluzione del T2DM (Han MS et al., 2005; Vidal J et al., 2008; Silecchia G et al., 2006), indipendentemente dalla perdita di peso e dalla normalizzazione della massa grassa (Rizzello M et al., 2010). Questi dati suggeriscono un meccanismo addizionale che contribuisce al miglioramento del profilo insulinico in pazienti affetti da T2DM, confermando che SG rappresenta qualcosa in più di una procedura restrittiva. La ghrelina sembrerebbe sopprimere l'adiponectina (ormone stimolante la sintesi di insulina), bloccare il *signaling* insulinico a livello epatico e inibire la secrezione di insulina. E' stato ipotizzato che i ridotti livelli di ghrelina sono in grado di aumentare la capacità massima del rilascio insulinico glucosio-indotto e di permettere a isole pancreatiche di secernere più insulina per soddisfare l'aumentata domanda associata all'obesità (Yada T et al., 2008). In questo modo, parte del miglioramento glicemico nel T2DM dopo LSG potrebbe essere determinato dalla riduzione dei livelli ghrelinici. Tuttavia, ad oggi, sono richiesti ancora studi per determinare gli effetti reali di LSG e delle altre procedure di chirurgia bariatrica sui disturbi metabolici obesità-correlati e il complesso meccanismo attraverso il quale essi interagiscono. Nonostante, il principale impatto di LSG nella regolazione ormonale del peso sia esercitato sulla ghrelina, rimane ancora da chiarire, se il beneficio fisiologico legato alla sua ridotta produzione post-LSG verrà perso con il tempo, attraverso altri



meccanismi come l'iperplasia gastrica post-chirurgica, o se altri siti di produzione ghrelinica, come il duodeno e il cervello, potranno ripristinare i suoi valori normali nel tempo.

## **SINDROME DI PRADER-WILLI**

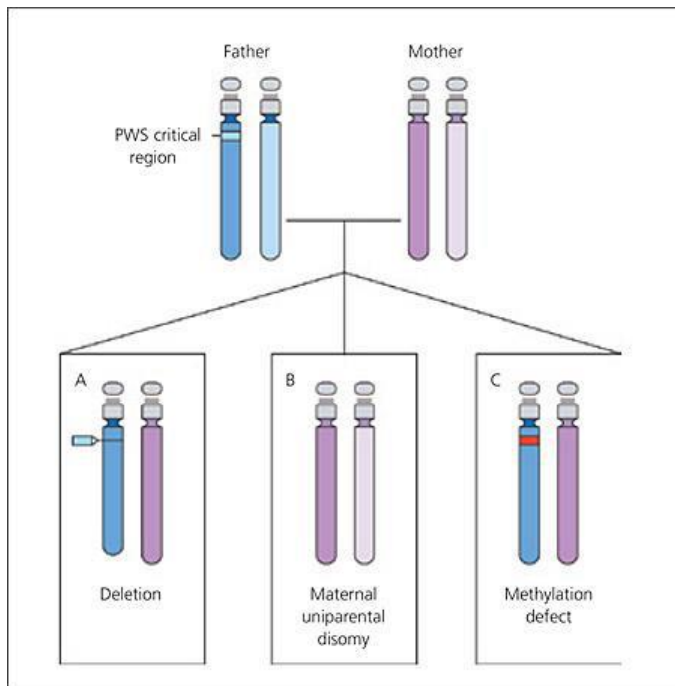
### **Genetica ed eziologia**

La sindrome di Prader-Willi, PWS, è una forma di obesità genetica sindromica accompagnata da fenotipi caratteristici, quali iperfagia, ipogonadismo e deficit di GH, causata dall'assenza nel cromosoma paterno del segmento 15q11-13. PWS, è stata descritta per la prima volta nel 1956 dagli endocrinologi Prader, Labhart e Willi. Questi studiosi hanno descritto 9 pazienti (5 maschi e 4 femmine) di età compresa tra i 5 e i 23 anni, con presentavano estrema ipotonia neonatale. Inoltre questi bambini erano privi di emozioni, incapaci di piangere, con difficoltà nella suzione e riflessi deboli o assenti, che portavano ad una difficoltà nella nutrizione. Prader, Labhart e Willi notarono che la sindrome progrediva, intorno ai 2 anni di età, fino all'obesità insieme a ritardo dell'accrescimento, ipogonadismo, bassa statura, ipotonia, mani e piedi piccoli, disturbi nell'apprendimento e insorgenza di obesità grave dopo l'infanzia (Clarke DJ et al., 1995).

Da allora sono stati svolti molti studi genetici per comprendere la causa di questa patologia; è stata la prima forma di sindrome da microdelezione a essere conosciuta ed è diventata, tra queste, la più comune. Sono stati creati dei modelli murini della patologia, ma nessuno presentava fenotipo obeso, per cui risultavano strumenti poco validi per esaminare uno degli aspetti predominanti della patologia (Goldstone AP, 2004).

L'obesità rappresenta un grave problema per questi pazienti poiché è la causa di numerose patologie secondarie, quali insulino-resistenza, (e conseguente DT2), problemi respiratori e cardiovascolari, che se non curate aumentano il rischio di morbilità e mortalità. Per questo motivo è di fondamentale importanza una corretta e precoce diagnosi della patologia, al fine di aumentare l'aspettativa di vita di questi pazienti.

In circa il 70% dei casi, l'anormalità consiste in una delezione del cromosoma 15, probabilmente danneggiato al momento del concepimento. La parte deleta è indicata con 15q11-q13. S'ipotizza che vari siano i geni mancanti e solo alcuni sono stati identificati. Nel 28% circa dei casi la sindrome è causata da disomia materna, cioè ambedue i geni sono ereditati dalla madre (e quindi nessuno dal padre). In meno del 5% dei casi si hanno difetti dell'imprinting (Gunay-Aygun M et al., 2001). Infine meno dell'1% dei casi è dovuto a traslazioni cromosomiche bilanciate o altre anomalie.



**Fig. 11:** Cause di PWS. Questo diagramma rappresenta il cromosoma 15 di un padre sano (blu con regione critica per PWS più chiara) e una madre sana (rosa). I bambini rappresentano i 3 diversi meccanismi eziopatogenici di PWS: A=delezione nella regione PWS sul cromosoma 15 ereditata dal padre (70%); B= sono ereditati entrambi i cromosomi 15 dalla madre e la regione PWS paterna viene persa (25%); C=difetto nella metilazione inattivante ereditato dal padre (<1%).

© 2005 DARRYL LEJJA

Riscuote particolare credito la convinzione che i geni mancanti comportino carenze di informazioni riguardanti l'ipotalamo, regolatore di molti meccanismi ormonali. Esso, infatti, regola ormoni che influiscono sulla crescita, sullo sviluppo sessuale, sull'appetito, sui ritmi sonno-sveglia e sul controllo emotivo. Varie sono le implicazioni mediche. La sindrome comporta un aumentato rischio di ulteriori disabilità fisiche: strabismo e miopia sono molto comuni; la scoliosi, dovuta all'ipotonia muscolare, è più comune che nel resto della popolazione; sono frequenti eczemi.

Esistono alcune differenze cliniche tra individui PWS risultante da delezione di 15q e quelli verificatesi per disomia uniparentale materna. Questi ultimi, infatti, hanno caratteristiche fenotipiche della patologia, ovvero tipico aspetto facciale, occhi a mandorla, ipopigmentazione di pelle occhi e capelli (simil albinismo),

labbro superiore sottile e rivolto verso il basso, più lievi (Dykens EM, 2002). Inoltre sembra abbiano minori problemi comportamentali, diminuito *skin-picking* (escoriazioni cutanee autoprovocate) e quoziente intellettivo leggermente più elevato. Tutti questi aspetti, però, a volte sono motivo di diagnosi tardiva (Gunay-Aygun M et al., 1997, Dykens EM et al., 1999). Tuttavia, i PWS con disomia uniparentale sono più soggetti a psicosi e fenomeni di autismo (Whittington J et al., 2004, Holland AJ et al., 2003). Si ritiene che, in parte, una causa dell'insorgenza di questo difetto genetico sia una gravidanza in età avanzata. I pazienti PWS che presentano microdelezione, sono fenotipicamente simili a quelli PWS, ma senza iperpigmentazione.

### **Epidemiologia**

Diversi studi epidemiologici stimano che l'incidenza di PWS è di circa 1:8000 e 1:25000 nati vivi. Questo probabilmente è un dato sottostimato, poiché molti individui affetti da tale patologia non sono stati diagnosticati precocemente.

Quando la sindrome è dovuta a una microdelezione nel centro che controlla i processi d'imprinting nella regione 15q11-q13 vi può essere più di un individuo con sindrome di Prader-Willi nella stessa famiglia. La sindrome riguarda tutte le razze ed entrambi i sessi (Chen C et al., 2007).

Individui PWS affetti da complicanze secondarie dovute all'obesità hanno più elevato rischio di morbilità e mortalità (Schrander-Stumpel CT et al., 2004, Stevenson DA et al., 2004). Basandosi su uno studio di popolazione, il tasso annuale di mortalità di pazienti PWS è circa il 3% (Whittington JE et al., 2001).

### **Diagnosi e quadro clinico**

La diagnosi prenatale di PWS non è prassi comune, poiché la rilevazione di microdelezioni non viene svolta nell'amniocentesi e sui prelievi standard del villo corionico che si usano per altre sindromi genetiche correlate all'età della madre. Generalmente questi bambini nascono al giusto termine e rientrano nei parametri normali di peso e lunghezza, ma hanno punteggi di Apgar spesso bassi.

Molte manifestazioni cliniche della PWS sono secondarie a insufficienza ipotalamica; tra queste, nell'infanzia, quella che più di tutte spinge alla diagnosi mediante specifici test è una significativa ipotonia centrale, che causa riduzione

dei movimenti, letargia, pianto debole e scarsa capacità di suzione (Aughton DJ et al., 1990).

I pazienti con pws presentano anche alcune caratteristiche facciali tipiche: occhi a mandorla, strabismo, ipopigmentazione rispetto al resto della famiglia, labbro superiore sottile (Holm VA et al., 1993). Inoltre, sia alla nascita che durante la vita, sono evidenti i problemi di termoregolazione e ipogonadismo (Crinò A et al., 2003).

Il test previsto per la diagnosi di PWS è un'analisi della metilazione, seguita, se positiva, da ibridazione in situ con fluorescenza (FISH), per determinare se la causa è dovuta a una delezione (Monaghan KG et al., 2002). Purtroppo, però, i bambini con ipotonia più lieve e minori problemi nell'assunzione di cibo non vengono diagnosticati fino a quasi 6 anni di età, periodo in cui avviene lo sviluppo di obesità.

La ricerca di cibo e l'obesità che ne consegue, che di solito si manifestano a 2 o 3 anni di età, uniti a movimenti non fini e a ritardo del linguaggio, dovrebbero portare i pediatri a sospettare la PWS. Altre caratteristiche spesso presenti sono: stati ossessivo-compulsivi, alta soglia del dolore e disturbi del sonno. Crescendo, si evidenziano anche bassa statura, mancanza di stimolo puberale alla crescita, incompleto sviluppo puberale, infertilità e mani e piedi piccoli (Dykens EM et al., 1996).

## **Anomalie neuroendocrine e metaboliche**

### ***Iperfagia e obesità***

Nei neonati PWS, la prevenzione e il trattamento della difficoltà nell'assunzione di cibo richiedono strategie mirate per settimane e mesi. Tra gli 1 e i 6 anni, invece, si verifica l'insorgere di iperfagia e obesità. L'iperfagia sembra essere dovuta ad un'anormalità ipotalamica che causa mancanza di sazietà (Holland AJ et al., 1993). In questi pazienti sono stati osservati elevati livelli di ghrelina e si sono svolti molti studi per correlare questo dato all'obesità tipica della PWS. La ricerca di cibo diventa esasperata e può portare anche all'ingestione di oggetti non commestibili, cibi per animali, cibi congelati e persino al furto come mezzo di sostentamento. Inoltre, anche dopo assunzione di cibo, lo stimolo di fame si ripresenta rapidamente. Il basso metabolismo, la ridotta richiesta

calorica, l'incapacità a vomitare, unitamente a ridotta attività fisica e bassa spesa energetica contribuiscono allo sviluppo di obesità.

Come conseguenza del deficit di GH, i soggetti PWS hanno una diminuita massa magra e un aumentato rapporto massa grassa/massa magra anche nei bambini ancora normopeso (Butler MG et al., 1988). L'obesità è di solito distribuita centralmente con relativo surplus nelle estremità distali e deposizione di grasso su addome, glutei e cosce che si verifica anche in soggetti PWS non ancora sovrappeso.

L'obesità è la maggior causa di morbilità e mortalità e può predisporre all'insorgenza di problemi secondari cardiaci, polmonari, ipertensione, DT2, tromboflebiti e apnea notturna. L'insorgenza di DT2 è molto precoce, a volte intorno ai 20 anni di età.

### ***Ritardo della crescita e deficit di GH***

Alla nascita i bambini PWS hanno di solito valori normali di peso e altezza, ma la difficoltà nell'assunzione di cibo che si verifica già dai primi mesi di vita può portare alla caduta fino al 3° percentile. La bassa statura si evidenzia dopo i 15 anni di età; l'altezza media di un adulto PWS è di 155 cm per i maschi e di 148 cm per le femmine (Dykens EM et al., 1996). La causa della bassa statura è correlata alla mancanza della spinta alla crescita tipica dell'età puberale e al deficit di GH. Si è dimostrato che il trattamento con GH aumenta l'altezza e la massa magra (Angulo M et al., 1996).

### ***Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi***

L'ipogonadismo di questi pazienti è di origine ipotalamica ed è generalmente caratterizzato da deficit di gonadotropine, estrogeni e testosterone. Insorge in età prenatale e si manifesta con ipoplasia genitale, sviluppo puberale incompleto e infertilità. Lo sviluppo puberale avviene intorno ai  $14 \pm 3,2$  anni nei ragazzi e nelle ragazze intorno ai  $12,6 \pm 2,7$  anni (Crinò A et al., 2003).

### **Terapia con GH**

A partire dal 2000 la Food and Drug Administration (FDA), ha approvato la terapia ormonale sostitutiva con GH per i pazienti PWS. Studi relativi a terapia sostitutiva su questi soggetti hanno mostrato benefici dall'infanzia fino all'età

adulta (Carrel AL et al., 2006). Il trattamento con GH incrementa la crescita, consente la spinta puberale all'accrescimento e può normalizzare l'altezza. Sebbene persista una distribuzione più centrale di adipi, la massa grassa diminuisce di circa il 10% e aumentano, invece, massa muscolare e ossea, diminuendo il rapporto massa grassa/massa magra.

La terapia sostitutiva con GH può essere iniziata nell'infanzia o al momento della diagnosi. La dose giornaliera raccomandata è 1,0 o 1,5 mg/m<sup>2</sup>. A fronte di queste evidenze, molti sono gli interrogativi sull'utilizzo di GH, e, sebbene per molti pazienti resti una valida terapia, sono stati avviati diversi studi longitudinali per chiarirne maggiormente il rapporto rischio-beneficio.

La PWS è una patologia che, per le sue svariate manifestazioni cliniche, richiede una terapia multidisciplinare con la collaborazione tra pediatri, endocrinologi, nutrizionisti, psicologi, familiari e insegnanti. Vanno infatti curati sia i sintomi più gravi e evidenti come l'iperfagia e l'obesità, ponendo molta attenzione anche all'ossessione verso il cibo, il deficit di crescita, ma anche i ritardi nel linguaggio e nell'apprendimento e i disturbi comportamentali.

### **Alterazioni peptidergiche nei pazienti PWS**

Come discusso precedentemente, la ghrelina stimola l'assunzione di cibo attivando neuroni ipotalamici NPY/AgRP-ergici e l'iperattività di questi neuroni porta ad iperfagia e obesità; inoltre un'iperstimolazione di NPY può causare ipogonadismo e deficit di GH (Kalra SP et al., 1999). Analisi ipotalamiche post-mortem in pazienti con PWS non dimostrano alcuna anomalia dei neuroni rilascianti NPY, AgRP e GHRH. Ugualmente, i neuroni rilascianti POMC e CART, peptidi anoressigeni, non sembrano essere alterati (Goldstone AP et al., 2003; Goldstone AP et al., 2002).

Molti studi hanno dimostrato che i livelli di ghrelina nel plasma a digiuno sono enormemente elevati sia nei pazienti PWS adulti che nei bambini e potrebbero contribuire alla loro iperfagia; questo non succede nelle altre forme di obesità, in cui i livelli plasmatici di ghrelina sono, invece, ridotti; nei soggetti normopeso in condizioni di bilancio energetico positivo, (Ravussin E et al., 2001).

Le vie coinvolte nell'iperfagia nei PWS potrebbero comprendere anche i circuiti di assuefazione e ricompensa, come il sistema limbico, l'amigdala e le vie

ascendenti contenenti serotonina, noradrenalina e dopamina. Questi potrebbero anche influire sui problemi comportamentali associati alla PWS (Akefeldt A et al., 1998).

In uno studio di Goldstone et al. del 2002, si dimostra la presenza di un'isoforma funzionante del recettore della leptina OB-Rb nei linfociti dei soggetti PWS, ma l'espressione di questo recettore nell'ipotalamo di questi pazienti non è stata riportata. La leptina inibisce l'espressione genica di NPY nel ARC, e, poiché i livelli sono proporzionali alla quantità di tessuto adiposo, anche nei soggetti PWS le concentrazioni di questo peptide sono elevate; questo avvalorava l'ipotesi di leptino-resistenza (Hoybye C, 2003).

Charlotte Hoybye C nel 2003, in uno studio che valutava gli aspetti endocrinometabolici dei pazienti PWS, ha dimostrato che i livelli di leptina erano elevati, riflettendo l'obesità. I livelli di NPY non erano elevati, indicando che questo peptide non è probabilmente candidato a essere tra i peptidi oreogenici che portano a iperfagia nei PWS. Swaab F et al. nel 1995, mostravano che nei soggetti PWS adulti i neuroni produttori di ossitocina nel PVN erano ridotti, per questo si può potenzialmente correlare la ridotta presenza di ossitocina, un peptide anoressigenico, con l'iperfagia. D'altro canto, i livelli di ossitocina sembrano essere più elevati nell'obesità semplice rispetto ai controlli normopeso. I livelli circolanti di ossitocina risultavano ridotti, mentre quelli di ghrelina elevati, di conseguenza ghrelina e ossitocina potrebbero essere coinvolti nell'iperfagia. NPY, ghrelina e leptina non cambiano durante il trattamento con GH (Hoybye C et al., 2003). O'Dorisio TM et al., nel 1983 notarono in pazienti PWS, un ridotto rilascio basale e postprandiale di polipeptide pancreatico, PP, il primo ormone peptidico della famiglia PP-fold identificato. Il rilascio di PP nei soggetti normopeso aumenta in seguito ad assunzione di cibo e rimane elevato per circa 6 ore dopo il pasto; esso è inversamente correlato al peso corporeo, implicando un ruolo nella sazietà. Negli obesi, infatti, si osserva una ridotta secrezione di PP.

In uno studio di Haqq AM et al. del 2007, nei bambini PWS venivano trovati livelli elevati di adiponectina, peptide inversamente correlato con alla quantità di adipe, che migliora la sensibilità insulinica; tali risultati sono associabili alla ipoinsulinemia registrata nei bambini PWS da uno studio di Goldstone AP del 2005.

Molto interessante è anche il ruolo svolto dall'obestatina, un peptide di recente scoperta. Come descritto nelle pagine precedenti, l'obestatina ha effetto anoressigenico. Nei bambini PWS fino ai 3 anni di età, l'obestatina è presente in concentrazioni elevate per poi diminuire col tempo; questo rispecchia l'iniziale difficoltà all'assunzione di cibo e la successiva iperfagia (Butler MG et al., 2007). Occorrono, quindi, ulteriori studi per approfondire il suo ruolo nella PWS.



## SCOPO DELLA RICERCA

---

L'obesità è una malattia cronica ad eziologia multifattoriale in cui l'alterazione del bilancio energetico porta all'accumulo eccessivo di tessuto adiposo nell'organismo. Gli interventi dietetici, farmacologici o le modificazioni dello stile di vita nei pazienti gravemente obesi offrono spesso scarsi risultati, mentre la chirurgia bariatrica rappresenta la terapia più promettente. Infatti, questo tipo di intervento determina un miglioramento della qualità della vita dei pazienti, portando ad una significativa e duratura perdita di peso, miglioramento del profilo cardiovascolare e remissione del diabete mellito di tipo 2.

Attualmente più di due miliardi di adulti e bambini nel mondo sono in sovrappeso o obesi (Popkin BM et al., 2012). In USA oltre il 68% della popolazione è in sovrappeso e tra questi almeno la metà è obesa (Ogden CL et al., 2014). Indubbiamente, lo stressante stile di vita della civiltà moderna ha favorito la diffusione dei *fast food* e, di conseguenza, un bilancio energetico fortemente positivo. Infatti, l'assunzione di cibo ad alta velocità, combinata con la distrazione mentre si mangia (per esempio, guardare la televisione), si ritiene possa compromettere la capacità del corpo di regolare omeostaticamente il suo bilancio energetico poiché compromette l'associazione congruente tra i segnali sensoriali e le conseguenti variazioni metaboliche. Inoltre, il cibo a disposizione nella società occidentale è caratterizzato da una grande varietà di cibi palatabili, ad alto contenuto energetico e di facile consumo. Questo tipo di alimenti promuove un bilancio energetico positivo, in quanto possiede ridotti effetti sazianti per unità energetica. Un'ipotesi emergente riguarda il ruolo del sistema di gratificazione (*reward*) che opera a livello cerebrale e che in risposta allo stimolo di cibi palatabili, andrebbe ad escludere i segnali omeostatici che regolano il peso corporeo (Zheng H et al., 2008).

I comportamenti alimentari sono da tempo di interesse, come fattori che contribuiscono allo sviluppo dell'obesità (Hill SW et al. 1984); per esempio è stato dimostrato che esiste una correlazione positiva tra velocità nel mangiare e BMI (Otsuka R et al. 2006). Inoltre, recentemente, Monteleone et al. (Monteleone P et al., 2005; Monteleone P et al., 2012) hanno dimostrato che in soggetti normopeso il consumo di cibo palatabile è associato all'aumento dei livelli circolanti di ghrelina e 2-AG, mentre questa risposta è assente nelle

donne con anoressia nervosa. Questi risultati devono essere ancora confermati nei pazienti obesi, con il fine di comprendere meglio in un contesto fisiopatologico il fenomeno “fame edonica”, che potrebbe fortemente influenzare l’assunzione di cibo e il BMI.

Alcuni studi hanno dimostrato che l’effetto anoressizzante del PYY è mantenuto in pazienti obesi, anche se i livelli del peptide sono ridotti a digiuno e in fase postprandiale (Batterham RL et al., 2003). Inoltre, i soggetti obesi presentano livelli più bassi di ghrelina che possono aumentare a seguito della perdita di peso raggiunta sia con la sola dieta che con la combinazione di dieta ed esercizio fisico (Hansen et al., 2002). Sebbene diversi studi abbiano indagato il ruolo dei peptidi gastrointestinali oreoressigenici e anoressigenici nella fisiopatologia dell’obesità sindromica, come la sindrome di Prader-Willi, vi è disaccordo riguardo l’esistenza di una disregolazione di questi ormoni nell’iperfagia associata a questa condizione clinica.

Una migliore conoscenza dei meccanismi fisiopatologici e neurocomportamentali sottostanti l’obesità e, in generale i disordini alimentari, è necessaria per prevenire comportamenti rischiosi e per lo sviluppo di nuove terapie efficaci. Di conseguenza, considerando il ruolo cruciale dei segnali periferici nella regolazione fisiologica ed edonica dell’assunzione di cibo e nella fisiopatologia di diversi disordini alimentari, nel presente lavoro di tesi si è voluto studiare dinamicamente la loro secrezione in funzione dei comportamenti alimentari che possono contribuire allo sviluppo di obesità.

Precisamente, sono stati condotti tre studi:

- IV. effetto della velocità dell’assunzione di cibo sulla secrezione postprandiale di PYY e GLP-1 in adulti con sindrome di Prader-Willi;
- V. effetto della velocità dell’assunzione di cibo sulla secrezione postprandiale di PYY e GLP-1 in adulti obesi prima e dopo essere stati sottoposti all’intervento di *sleeve gastrectomy* in laparoscopia;
- VI. effetto dell’assunzione di cibo palatabile sulla secrezione di PYY, GLP-1, ghrelina ed endocannabinoidi in adulti obesi precedentemente saziati.

## **Studio I**

PWS è una patologia neurogenetica caratterizzata da iperfagia, con conseguente grave obesità, se non si interviene prontamente con una severa restrizione alimentare (Emerick JE et al., 2013; McAllister CJ et al., 2011). Diversi studi hanno dimostrato livelli marcatamente elevati, a digiuno, del peptide oreogenico ghrelina, in bambini e adulti con PWS, suggerendo così che l'ipersecrezione di ghrelina potesse essere implicata nell'iperfagia e nella ritardata cessazione del pasto (Bizzarri C et al., 2004). Al contrario, solo pochi studi hanno indagato i livelli di GLP-1 e PYY postprandiali nei soggetti con PWS, oltre a riportare risultati contrastanti (Bizzarri C et al., 2010; Butler MG et al., 2004; Goldston AP et al., 2005; Giménez-Palop O et al., 2004; Paik KH et al., 2007; Purtell L et al., 2011).

Recentemente, abbiamo dimostrato che mangiare lo stesso pasto in oltre 30 min invece di 5 min, porta ad alte concentrazioni di GLP-1 e PYY e favorisce la sazietà in adolescenti obesi; questo controllo fisiologico del cibo, invece, risulta essere assente in adulti obesi (Rigamonti AE et al., 2013).

Per quanto noto, le concentrazioni postprandiali di peptidi anoressizzanti come il GLP-1 e PYY non sono state valutate nei pazienti con PWS in funzione della velocità di assunzione del cibo. Inoltre, una possibilità intrigante è che l'assunzione rapida del pasto possa indurre una maggiore sazietà e più alte concentrazioni di peptidi anoressigenici, confermando l'esistenza di un diverso substrato fisiopatologico in questo disturbo rispetto a soggetti affetti da obesità semplice (Cassidy SB et al., 2012).

Di conseguenza, questo studio ha voluto esaminare possibili differenze nelle risposte postprandiali di GLP-1, PYY, glucosio, insulina e trigliceridi quando pasti identici (gelato) sono stati consumati in due sessioni separate di diversa durata (*fast feeding vs slow feeding*) da pazienti adulti con PWS, confrontati con soggetti normopeso e pazienti con obesità semplice, di pari età.

## **Studio II**

LSG è un'operazione bariatrica effettuata in pazienti obesi con BMI < 50 kg/m<sup>2</sup> (Baltasar A et al., 2005). Nonostante siano stati pubblicati primi risultati entusiasmanti sulla perdita di peso conseguente a LSG (Langer FB et al.,

2006), il meccanismo sottostante la perdita di peso rimane ancora da chiarire. Particolare importanza è stata attribuita alle riduzioni post-operatorie dei livelli circolanti del peptide oreogigenico ghrelina, prodotto da specifiche cellule neuroendocrine localizzate nel fondo gastrico, rimosso durante LSG (Anderson B et al., 2013).

Un altro meccanismo responsabile della soddisfacente perdita di peso, conseguente all'intervento "restrittivo" di chirurgia bariatrica è legato alla possibilità che l'assunzione rapida di un pasto (e non lenta) possa indurre un maggior senso di sazietà e concentrazioni più elevate dei peptidi gastrointestinali anoressigenici dopo LSG. Per quanto noto, le concentrazioni postprandiali degli ormoni anoressigenici gastrointestinali non sono state valutate in soggetti obesi sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica. In funzione della velocità di assunzione dello stesso pasto.

Di conseguenza, abbiamo voluto esaminare le possibili differenze nella risposte post-prandiali di GLP-1, PYY, nel il senso di fame e di sazietà, e nei livelli circolanti di glucosio, insulina e trigliceridi, quando pasti identici (gelato) sono stati consumati in due sessioni separate di diversa durata (*fast feeding vs slow feeding*) da pazienti adulti obesi prima e 3 mesi dopo LSG.

### **Studio III**

L'abbondante disponibilità di cibo palatabile nella dieta occidentale svolge un ruolo cruciale nello sviluppo di questa patologia (Yeomans MR et al., 2004). Infatti, il cibo palatabile ad alto contenuto di grassi o di zuccheri come il cioccolato può motivare l'assunzione di cibo nonostante una condizione di sazietà e di bilancio energetico positivo. Questo fenomeno è definito "fame edonica" e si contrappone alla "fame omeostatica", che è essenzialmente innescata da una deprivazione energetica. Mentre i circuiti ipotalamici regolano l'assunzione di cibo in funzione dell'omeostasi energetica, le proprietà edoniche del cibo vengono processate dai circuiti della ricompensa cortico- limbici. Un ruolo come mediatore dei processi di ricompensa è stato dimostrato per il peptide oreogigenico ghrelina (Jerlhag E et al., 2007; Dickson SL et al., 2011). Infatti il recettore della ghrelina, GHS-R1a, è espresso oltre che a livello ipotalamico, anche a livello delle aree tegmentali e mesolimbiche coinvolte nel

sistema di gratificazione (*reward*), come l'area ventro-tegmentale (VTA) e le aree laterodorsali-tegmentali (LDTg). Anche gli eCBs, come AEA e 2-AG, svolgono un ruolo centrale nella stimolazione dell'assunzione di cibo.

Essi esercitano la loro funzione attivando il recettore CB1, ampiamente distribuito in diverse aree cerebrali, coinvolte sia nella regolazione dell'assunzione di cibo omeostatica che in quella edonica (Di Marzo V et al., 2009; Cristino L et al., 2014). Nell'uomo in condizioni fisiologiche, gli eCBs aumentano a seguito della deprivazione di cibo e diminuiscono dopo assunzione di cibo sia a livello ipotalamico sia nelle aree limbiche (Di Marzo V et al., 2009). Il consumo di cioccolato rappresenta un paradigma di "fame edonica" che viene spesso utilizzato nei modelli animali di iperfagia e obesità, ma per quanto noto, i suoi effetti sui livelli di eCBs non sono mai stati valutati. Di conseguenza, al fine di valutare il ruolo degli eCBs e dei peptide gastrointestinali, come ghrelina, PYY e GLP-1, nella fame edonica in pazienti obesi, abbiamo deciso di valutare le variazioni dei livelli circolanti di questi mediatori prima e dopo il consumo di cioccolato in soggetti gravemente obesi precedentemente saziati.

# ***MATERIALI E METODI***

---

## **STUDIO I**

### **Soggetti**

Pazienti PWS (età:  $35 \pm 1,6$  anni; 1F/5M. BMI:  $39,4 \pm 3,1$  kg/m<sup>2</sup>) e pazienti con obesità semplice (età:  $30,1 \pm 3,2$  anni; 7F/2M, BMI:  $44,1 \pm 1,9$  kg/m<sup>2</sup>) sono stati reclutati presso la Divisione di Auxologia e Malattie Metaboliche, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Verbania (IT), dove erano ricoverati per un programma multidisciplinare di riduzione del peso corporeo. È stato anche reclutato un gruppo di soggetti sani normopeso (età:  $29,8 \pm 9$  anni; 2F/2M. BMI:  $24,2 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup>). Tutti i pazienti con obesità semplice soffrivano di un grave sovrappeso dall'età adolescenziale. Tutti i pazienti PWS mostravano il tipico fenotipo (Cassidy SB et al., 2012). L'analisi d'ibridizzazione con fluorescenza in situ (FISH) ha rivelato delezione interstiziale del braccio lungo prossimale del cromosoma 15 paternamente derivata in tutti i pazienti PWS. I criteri di esclusione includevano precedente diagnosi di una malattia che colpisce il sistema endocrino e del metabolismo (a parte l'obesità semplice o la PWS), uso cronico di farmaci (compresi i contraccettivi orali) che influiscono sul metabolismo e/o dell'appetito, abuso di sostanze, cambiamento di peso  $\geq 5$  kg durante i tre mesi precedenti la partecipazione allo studio, gravidanza, allergie ai componenti del pasto di prova (vedi sotto), disturbi alimentari clinicamente diagnosticati o un punteggio  $\geq 20$  sul Test dei Disturbi Alimentari (solo per i soggetti non PWS) (Garner DM et al., 1982). Tutti i soggetti PWS mostravano un lieve ritardo mentale e, a questo proposito, il requisito per la partecipazione allo studio è stato un punteggio al di sopra del valore di cut-off di 24 nel Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein MF et al., 1975). I tre gruppi sperimentali (soggetti normopeso, pazienti con obesità semplice e pazienti PWS) erano di livello socioeconomico omogeneo quando valutato da uno specifico questionario (Robert Koch Institute, 1998). Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale. Tutti i soggetti, normopeso e pazienti obesi hanno partecipato a questo studio dopo aver fornito il proprio consenso libero e informato. Per i pazienti PWS, il consenso informato scritto è stato ottenuto dai loro genitori.

## Procedura sperimentale

Le caratteristiche antropometriche sono state valutate durante il periodo di screening. BMI è stato calcolato da altezza e peso misurati. Il protocollo sperimentale era costituito da due prove separate (*fast feeding* e *slow feeding*), effettuate in ordine casuale, in due giorni diversi con un intervallo tra loro di almeno 5 giorni. Pazienti PWS e obesi sono stati testati durante la prima settimana di ospedalizzazione per il programma di riduzione del peso corporeo multidisciplinare integrato. Dopo 12 ore di digiuno, i soggetti cominciarono ciascuna delle due prove nello stesso periodo di tempo, tra le 8:00 e 8:30 AM. I soggetti sono stati istruiti a rispettare rigorosamente la dieta e i programmi di attività fisica durante il giorno che precede ogni test e ad astenersi da strenuo sforzo fisico, caffeina e fumo durante le 12 ore di digiuno. I soggetti erano costantemente richiamati verbalmente al il rispetto di queste istruzioni. Per mantenere stabile l'apporto calorico giornaliero dei pazienti ricoverati (obesi e PWS), la quantità di cibo somministrata a pranzo e cena nei giorni della sperimentazione, è stata proporzionalmente ridotta in base alle calorie assunte con il pasto di prova.

Durante ciascuna delle due prove, una cannula endovenosa per il prelievo di sangue è stata inserita in una vena superficiale dell'avambraccio, mantenuta pervia da infusione lenta di soluzione fisiologica. Tutti i soggetti hanno consumato lo stesso pasto di prova composto da 10 kcal/kg di gelato per un massimo di 510g (59% delle kcal grassi, 33% di carboidrati, 8% di proteine; composizione lipidica per 100g di prodotto: acidi grassi monoinsaturi 3,49g; acidi grassi polinsaturi 0,4 g; acidi grassi saturi 7,48g; colesterolo 91mg) in entrambe le prove. Durante la sessione di *fast feeding*, l'intera quantità di gelato è stata consumata entro 5 min, mentre nella sessione di *slow feeding*, la stessa quantità di gelato è stata divisa in sei porzioni uguali, somministrate al soggetto ogni 5 min e consumate entro 30 min. I soggetti sono stati istruiti a consumare ogni porzione in meno di un minuto, per mantenere una velocità di assunzione uniforme. Le caratteristiche qualitative e quantitative del pasto di prova sono state scelte per ottenere risposte marcate di PYY e GLP-1 in soggetti normopeso (Rigamonti AE et al., 2013). Sono stati prelevati campioni di sangue prima del pasto e a intervalli di 30 min dopo l'inizio del consumo del pasto fino al termine della sessione (210 min più tardi). PYY e GLP-1 sono stati misurati

in tutti i tempi, mentre glucosio, insulina e trigliceridi sono stati misurati fino a 150 min (vedi sotto). Scale visuoanalogiche (VASs), per la valutazione delle sensazioni soggettive di fame e sazietà sono state somministrate prima del pasto e a intervalli di 30 min dopo il termine del pasto fino alla conclusione della sessione dello studio (Flint A et al., 2000).

### **Analisi biochimiche**

I livelli plasmatici totali di PYY, includendo PYY<sub>1-36</sub> e PYY<sub>3-36</sub>, sono stati misurati tramite kit radioimmunologico (RIA) disponibile in commercio (Millipore, Saint Charles, MO, USA). La sensibilità del dosaggio era di 10 pg/mL. I coefficienti di variazione (CVs) intra- e interdosaggio erano di 2,9 e di 7,1% rispettivamente.

I livelli plasmatici totali di GLP-1, includendo GLP-1<sub>7-36</sub> ammide, GLP-1<sub>7-37</sub>, GLP-1<sub>9-36</sub> ammide, GLP-1<sub>9-37</sub>, GLP-1<sub>1-36</sub> ammide e GLP-1<sub>1-37</sub>, sono stati misurati mediante RIA dopo una procedura di estrazione (Millipore, Saint Charles, MO, USA). Un inibitore della DPP-4 è stato aggiunto alle provette per evitare la degradazione del GLP-1. La sensibilità del metodo era 3 pM; I CVs intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente 2,9 e 7,1%.

Le concentrazioni sieriche d'insulina sono state determinate mediante dosaggio immunometrico in chemiluminescenza (Immulite 2000; DPC, Los Angeles, USA). La sensibilità del metodo era 13pM; i CVs intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente 22-38% e 14-23%.

I livelli sierici di glucosio sono stati misurati con il metodo enzimatico della glucosio ossidasi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania), mentre i livelli di trigliceridi sierici sono stati quantificati con un metodo enzimatico colorimetrico (Wako Chemical, Gmbh, Neuss, Germany).

### **Analisi statistica**

I risultati sono riportati come media $\pm$ SEM.

Il modello omeostatico di resistenza all'insulina (HOMA-IR) è stato calcolato con la formula: [insulina (pM) \* glucosio (mM)]/135. Le risposte di glucosio, insulina, trigliceridi, PYY e GLP-1, VAS per fame e sazietà sono stati valutati come valori assoluti e anche come area sottesa alla curva (AUC) di misurazioni postprandiali, utilizzando il metodo trapezoidale, per ogni sessione (*fast feeding* e *slow feeding*).



Tutti i parametri (glucosio, insulina, trigliceridi, PYY, GLP-1 e VASs per la fame e la sazietà) sono stati confrontati all'interno di ciascun gruppo (soggetti normopeso, pazienti con obesità semplice o pazienti PWS) e tra le due sessioni sperimentali (*fast feeding* e *slow feeding*), utilizzando una ANOVA a due vie con misure ripetute, seguita dal test post hoc di Bonferroni. Un'ANOVA a una via è stata utilizzata per confrontare le AUCs dei sei gruppi (soggetti normopeso, pazienti con obesità semplice e pazienti con PWS per *fast feeding* e *slow feeding*). Le altre caratteristiche, demografiche, cliniche, metaboliche e ormonali dei soggetti dello studio sono state analizzate con il test t di Student per dati non appaiati. È stato scelto un valore di  $P=0,05$  come statisticamente significativo.

## **STUDIO II**

### **Soggetti**

Il presente studio è stato svolto in accordo ai principi etici della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale San Gerardo (Monza, Italy). È stato ottenuto il consenso informato scritto da parte di tutti i soggetti partecipanti, a seguito di una dettagliata spiegazione dello studio a cui sarebbero stati sottoposti. Per questo studio sono stati arruolati 10 pazienti con obesità patologica (età:  $38.8 \pm 12.0$  anni; F/M = 6/4; BMI:  $46.0 \pm 7.2$  kg/m<sup>2</sup>), considerati idonei per la *sleeve gastrectomy* verticale da un team multidisciplinare composto da chirurghi, endocrinologi, dietisti, endoscopisti, psichiatri e psicologi. La valutazione pre-operatoria includeva un'ecografia addominale, endoscopia del tratto gastrointestinale superiore, elettrocardiografia, ecocardiografia, valutazione cardiologica, test di funzionalità respiratoria, polisonnografia, visita pneumologica e valutazione dello stato nutrizionale. Gli psichiatri e gli psicologi hanno intervistato ciascun soggetto al fine di valutare il convincimento del paziente nel seguire una dieta rigida durante il decorso post-operatorio.

Il principale criterio di selezione per l'intervento era un BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>. Tutti i pazienti erano obesi da almeno 5 anni e non erano riusciti a perdere peso a seguito di ripetuti programmi di controllo del peso. I criteri di esclusione includevano una precedente diagnosi di una patologia del sistema endocrino e

del metabolismo (a parte l'obesità semplice), l'uso cronico di farmaci (compresi i contraccettivi orali) che influiscono sul metabolismo e/o sull'appetito, malattie psichiatriche, gravidanza, allergie ai componenti del pasto di prova (vedi sotto), disturbi alimentari clinicamente diagnosticati o un punteggio  $\geq 20$  sul Test dei Disturbi Alimentari (Garner DM et al., 1982). Tutte le donne erano eumenorreiche, ad eccezione di due donne che erano in post-menopausa. Con ogni paziente è stata effettuata una discussione accurata riguardo i benefici dell'operazione, la qualità di vita post-operatoria, la perdita di peso attesa, e le possibili complicazioni.

La tecnica LSG consisteva nella rimozione del fondo e della maggior parte della curvatura dello stomaco. Quattro trocars sono stati collocati e 38 Fr. Bougie sono stati usati per stabilire l'appropriata dimensione della *sleeve*. La parte della curvatura maggiore dello stomaco è stata tagliata a 4 cm dal piloro utilizzando una cucitrice lineare verso l'angolo di His per rimuovere completamente il fondo dello stomaco, al fine di ottenere un tubulo gastrico di 80-100 ml. Il restante margine gastrico formatosi dal taglio si trovava a 2 cm dalla curvatura minore dello stomaco. Dopo la transezione gastrica, la linea di escissione veniva rinforzata con una sutura in monofilamento di poligluconato 2-0. Tutti gli interventi di LSG sono stati effettuati dallo stesso team chirurgico.

### **Procedura sperimentale**

Le caratteristiche antropometriche sono state valutate durante il periodo di screening. Il BILMI è stato calcolato da altezza e peso misurati.

Il protocollo sperimentale era costituito da due prove separate (*fast feeding* e *slow feeding*), effettuate in due giorni diversi con un intervallo tra loro di almeno 5 giorni. Le due prove (*fast feeding* e *slow feeding*) venivano effettuate, secondo un ordine casuale, prima e 3 mesi dopo LSG (con un totale di 4 test per ciascun paziente)

Dopo 12 ore di digiuno, i soggetti cominciarono ciascuna delle due prove tra le 8:00 e 8:30 AM. I soggetti sono stati istruiti a rispettare rigorosamente la dieta e i programmi di attività fisica durante il giorno precedente ogni test e ad astenersi da strenuo sforzo fisico, caffeina e fumo durante le 12 ore di digiuno. Durante ciascuna delle due prove, una cannula endovenosa per il prelievo di

sangue è stata inserita in una vena superficiale dell'avambraccio, mantenuta pervia da infusione lenta di soluzione fisiologica.

Tutti i soggetti hanno consumato lo stesso pasto di prova composto da 10 kcal/kg di gelato per un massimo di 510g (59% delle kcal grassi, 33% di carboidrati, 8% di proteine; composizione lipidica per 100g di prodotto: acidi grassi monoinsaturi 3,49g; acidi grassi polinsaturi 0,4 g; acidi grassi saturi 7,48g; colesterolo 91mg) in entrambe le prove. Durante la sessione di *fast feeding*, l'intera quantità di gelato è stata consumata entro 5 min, mentre nella sessione di *slow feeding*, la stessa quantità di gelato è stata divisa in sei porzioni uguali, date al soggetto ogni 5 min e consumate entro 30 min. I soggetti sono stati istruiti a finire ogni porzione in meno di un minuto, per mantenere una velocità di assunzione uniforme. Le caratteristiche qualitative e quantitative del pasto di prova sono state scelte per ottenere risposte marcate di PYY e GLP-1 in soggetti normopeso (Rigamonti AE et al., 2013).

Sono stati prelevati campioni di sangue prima del pasto e a intervalli di 30 min dopo l'inizio del consumo del pasto fino al termine della sessione (210 min più tardi). PYY e GLP-1, glucosio, insulina e trigliceridi sono stati misurati in tutti i tempi. VASs, per la valutazione delle sensazioni soggettive di fame e sazietà sono state somministrate prima del pasto, a 5 min, a 15 min del pasto e a intervalli di 30 min dopo il termine del pasto fino alla conclusione della sessione di studio.

### **Analisi biochimiche**

I livelli plasmatici totali di PYY, includendo PYY<sub>1-36</sub> e PYY<sub>3-36</sub>, sono stati misurati tramite kit RIA disponibile in commercio (Millipore, Saint Charles, MO, USA). La sensibilità del dosaggio era di 10 pg/mL. I CVs intra- ed interdosaggio erano di 2,9 e di 7,1% rispettivamente.

I livelli plasmatici totali di GLP-1, compreso GLP-1<sub>7-36</sub> ammidato, GLP-1<sub>7-37</sub>, GLP-1<sub>9-36</sub> ammidato, GLP-1<sub>9-37</sub>, GLP-1<sub>11-36</sub> ammidato e GLP-1<sub>11-37</sub>, sono stati misurati mediante RIA dopo una procedura di estrazione (Millipore, Saint Charles, MO, USA). Un inibitore DPP-4 è stato aggiunto alle provette per evitare la degradazione del GLP-1. La sensibilità del metodo era 3 pM; i CVs intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente 2,9 e 7,1%.

Le concentrazioni sieriche d'insulina sono state determinate mediante dosaggio immunometrico in chemiluminescenza (Roche Diagnostics).

La sensibilità del metodo era 0,2  $\mu$ IU/ml; i CVs intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente 0,8-4,9% e 1,1-3,7%.

I livelli sierici di glucosio sono stati misurati con il metodo enzimatico della glucosio ossidasi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania), mentre i livelli di trigliceridi sierici sono stati quantificati con un metodo enzimatico colorimetrico (Roche Diagnostics).

### **Analisi statistica**

I risultati sono riportati come media $\pm$ SEM. Il modello omeostatico di resistenza all'insulina (HOMA-IR) è stato calcolato con la formula: [insulina ( $\mu$ IU/ml) \* glucosio (mg/dl)]/405. Per facilitare la comprensione dei paragoni multipli dei risultati, le risposte di glucosio, insulina, trigliceridi, PYY e GLP-1, VASs per fame e sazietà sono stati valutati come valori assoluti per ogni sessione (*fast feeding* prima e dopo LSG e *slow feeding* prima e dopo LSG). In ciascun gruppo, tra tutti i parametri studiati, non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i maschi e le femmine. Di conseguenza sono stati accorpati i dati relativi ai pazienti dello stesso gruppo. Dopo aver verificato la normalità della distribuzione dei dati, tutti i parametri (GLP-1, PYY, glucosio, insulina, trigliceridi e i valori delle VASs per il senso di fame e di sazietà) venivano confrontati all'interno dello stesso gruppo (ciascun punto temporale vs 0 min), tra i due contesti clinici (prima e dopo LSG) e tra le due velocità di assunzione del pasto (*fast feeding* and *slow feeding*) utilizzando un'ANOVA a tre vie (tempo x contesto clinico x velocità di assunzione del pasto) con misure ripetute, seguita dal test post hoc di Bonferroni. Le altre caratteristiche demografiche, cliniche, metaboliche e ormonali relative ai soggetti dello studio (prima e dopo LSG) sono state analizzate con il test t di Student per dati appaiati. È stato scelto un valore di  $P < 0,05$  come statisticamente significativo.

## **STUDIO III**

### **Soggetti**

Dieci maschi obesi, di età compresa tra i 19 e 44 anni (media  $\pm$  SD = 33.9 $\pm$ 9.0 anni), con un BMI medio  $\pm$  SD pari a 42.6 $\pm$ 3.5 kg/m<sup>2</sup> sono stati arruolati presso

la Divisione di Auxologia e Malattie Metaboliche, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Verbania (IT). A ciascun partecipante arruolato nello studio è stato richiesto di soddisfare i seguenti requisiti:

1) rispondere positivamente alla presente domanda: *“Il cioccolato è uno dei tuoi cibi preferiti, che vorresti mangiare anche quando sei già sazio, per puro piacere?”*;

2) attribuire un punteggio di palatabilità  $\geq 8$  per il cioccolato, all'interno della scala somministrata che va da 0 (non-palatabile) a 10 (massima palatabilità).

I criteri di esclusione includevano precedente diagnosi di una patologia del sistema endocrino e del metabolismo (a parte l'obesità semplice), uso cronico di farmaci che influiscono sul metabolismo e/o sull'appetito, una variazione di peso  $\geq 5,0$  kg durante i 3 mesi precedenti la partecipazione allo studio, allergie ai componenti del pasto di prova (vedi sotto), disturbi alimentari clinicamente diagnosticati o un punteggio  $\geq 20$  sul Test dei Disturbi Alimentari (Garner DM et al., 1982). Nessun soggetto era un fumatore di marijuana, faceva abuso di alcol o era un accanito fumatore di sigarette; tutte condizioni note per influenzare i livelli circolanti di eCBs.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico locale e tutti i soggetti hanno dato il loro consenso scritto dopo essere stati informati sulla natura e le procedure dello studio. Di conseguenza, ciascun soggetto era consapevole che, durante la prima sessione del protocollo sperimentale, avrebbe mangiato il cioccolato (stimolazione della fase cefalica).

### **Procedura sperimentale**

Le caratteristiche antropometriche venivano valutate durante il periodo di selezione. Il BMI veniva calcolato dall'altezza e dal peso misurati. La massa magra e la massa grassa venivano valutate con analisi dell'impedenza bioelettrica (Human-IM Scan, DS-Medigroup, Milano, Italia).

Lo studio ha utilizzato un disegno sperimentale a misure ripetute entro i soggetti, in cui ciascun volontario serviva come proprio controllo, simile a quello utilizzato da Monteleone et al. (2012)

Tutti i soggetti venivano testati due volte con un intervallo di almeno 7 giorni.

Un disegno sperimentale cross-over in singolo cieco e a quadrato latino non poteva essere applicato per le necessità sperimentali di somministrare cibo

non-palatabile con lo stesso ammontare di nutrienti (isobromatologico) e calorie (isoenergetico) del cibo palatabile consumato (vedi sotto).

Durante la prima sessione, i pazienti arrivavano presso l'Unità di Sperimentazione Clinica alle ore 8.30, dopo 12 ore di digiuno. Alle 9.00, venivano chiesti loro di indicare il loro senso di fame e di sazietà sulle VASs; immediatamente dopo questo veniva inserita una cannula endovenosa per i prelievi di sangue dell'intera prova in una vena superficiale dell'avambraccio, mantenuta pervia da infusione lenta di soluzione fisiologica. Ai soggetti veniva quindi servita una colazione di 300 kcal, con 77% carboidrati, 10% proteine e 13% grassi. Immediatamente dopo la colazione (consumata in 10 min), i pazienti indicavano il loro senso di fame e di sazietà attraverso le VASs. I campioni di sangue venivano prelevati a 0 min, 10 min e 30 min dall'inizio della prova. Dopo un'ora dall'inizio dello studio, ai soggetti veniva comunicato che avrebbero ricevuto il cioccolato. Immediatamente subito dopo, ciascun paziente veniva esposto a cibo palatabile per 10 min. Durante questo periodo, il paziente poteva odorare e guardare il cibo, ma non poteva mangiarlo. Al termine dell'esposizione, a ciascun partecipante veniva chiesto di indicare il proprio senso di fame e sazietà mediante VASs. I prelievi venivano effettuati a 60 min e 70 min dall'inizio del test. A questo punto, i pazienti erano liberi di mangiare il cibo palatabile (vedi sotto per i dettagli) entro 10 min. Ulteriori prelievi venivano effettuati immediatamente dopo l'esposizione di cibo palatabile (180 min) e a 100 min, 130 min, 160 min e 190 min; agli stessi intervalli di tempo dovevano indicare il loro senso di fame e sazietà sulle VASs. Al termine della sessione, veniva calcolato l'ammontare del cibo mangiato da ciascun partecipante, pesando il cibo residuo e sottraendolo dall'ammontare iniziale del cibo fornito; in questo modo venivano calcolate le calorie assunte.

Durante la seconda sessione i partecipanti erano sottoposti alle medesime procedure della prima sessione sperimentale, con l'eccezione che venivano esposti a cibo non-palatabile di cui dovevano mangiarne un ammontare con la stessa quantità di nutrienti e calorie del cibo palatabile assunto in 10 min durante la precedente sessione.

Durante l'esposizione al cibo (specificatamente da 60 min a 70 min), venivano mostrate 20 immagini rappresentanti cibo a base di cioccolato e paesaggi

naturali, rispettivamente durante la sessione con il cioccolato e con il cibo non-palatabile.

### ***Cibo palatabile e non-palatabile***

Il cibo palatabile era costituito da una tavoletta di cioccolato al latte (200 g per un totale di 1000 kcal con 61.4%carboidrati, 7.9% proteine, e 30.7% grassi), servito su un piatto da cui il soggetto potesse essere libero di mangiare fino a quando si fosse sentito sazio (per un massimo corrispondente all'intera tavoletta di cioccolato)

Il cibo non-palatabile, che veniva identificato da tutti i partecipanti come non desiderabile per puro piacere (specificatamente con un valore di palatabilità < 2) era costituito da pane e burro, combinato ad hoc per fornire lo stesso ammontare di nutrienti (isobromatologico) e calorie (isoenergetico) del cioccolato consumato. Le calorie e il contenuto di nutrienti del cibo palatabile e non-palatabile veniva calcolato utilizzando le informazioni riportate sulle etichette di ciascun cibo confezionato (tavoletta di cioccolato e burro). Per calcolare il contenuto di calorie e nutrienti del pane ci siamo basati sulla ricetta del panettiere che lo preparava. Per mantenere una stabile assunzione calorica giornaliera dei pazienti obesi ricoverati l'ammontare del cibo somministrato a pranzo e a cena dei giorni sperimentali veniva proporzionalmente ridotto in rapporto alle calorie assunte durante i pasti dei test sperimentali (cioccolato o cibo non-palatabile).

### **Analisi biochimiche**

I livelli plasmatici totali di ghrelina, includendo la ghrelina acilata e non acilata, sono stati misurati tramite kit RIA disponibile in commercio (Millipore, Saint Charles, MO, USA). La sensibilità del dosaggio era di 93 pg/mL. I CVs intra- ed inter-dosaggio erano di 10,0 e di 14,7% rispettivamente.

I livelli plasmatici totali di PYY, compreso PYY1-36 e PYY3-36, sono stati misurati tramite kit per dosaggio RIA disponibile in commercio (Millipore, Saint Charles, MO, USA). La sensibilità del dosaggio era di 10 pg/mL. I CVs intra- ed inter-dosaggio erano di 2,9 e di 7,1% rispettivamente.

I livelli plasmatici totali di GLP-1, compreso GLP-17-36 ammide, GLP-17-37, GLP-19-36 ammide, GLP-19-37, GLP-11-36 ammide e GLP-11-37, sono stati

misurati mediante RIA dopo una procedura di estrazione (Millipore, Saint Charles, MO, USA). Un inibitore DPP-4 è stato aggiunto alle provette per evitare la degradazione del GLP-1. La sensibilità del metodo era 3 pM; i CVs intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente 2,9 e 7,1%.

Le concentrazioni sieriche d'insulina sono state determinate mediante dosaggio immunometrico in chemiluminescenza (Immulite 2000; DPC, Los Angeles, USA). La sensibilità del metodo era 2  $\mu$ IU/ml; i CVs intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente 22-38% e 14-23%.

I livelli sierici di glucosio sono stati misurati con il metodo enzimatico della glucosio ossidasi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). I livelli plasmatici di AEA, 2-AG, OEA e PEA sono stati determinati mediante spettrometria di massa con diluizione isotopica descritta precedentemente (Annuzzi et al., 2010).

### **Analisi statistica**

I risultati sono riportati come  $media \pm SD$ . Le risposte di glucosio, insulina, ghrelina, PYY, GLP-1, AEA, 2-AG, PEA, OEA e delle VASs per fame e sazietà sono state espresse come valori assoluti e anche come AUC di misurazioni postprandiali, utilizzando il metodo trapezoidale, per ogni sessione (colazione + cioccolato e colazione + cibo non-palatabile); considerando  $AUC_{190}$  per ghrelina, GLP-1, PYY, VASs per il senso di fame e di sazietà, glucosio e insulina, e  $AUC_{60-190}$  per AEA, 2-AG, PEA e OEA.

Tutti i parametri (ghrelina, PYY, GLP-1, i valori delle VASs per il senso di fame e di sazietà, glucosio e insulina) venivano confrontati per ciascun tempo di prelievo, all'interno delle medesima sessione sperimentale (analisi intra-gruppo) e tra le due sessioni sperimentali (analisi inter-gruppo) utilizzando un'ANOVA a due vie, con misure ripetute (con i due fattori: tempo e sessione, e l'interazione tempo-sessione), seguita dal test post hoc di Turkey, che è stato applicato per confrontare le risposte dopo la colazione (T10, T30, e T60 vs. 0 min) e le risposte conseguenti al cioccolato o al cibo non-palatabile (T80, T100, T130, T160, e T190 vs. 70 min) per entrambe le sessioni sperimentali. Lo stesso test statistico è stato applicato per analizzare le risposte degli eCBs (AEA, 2-AG, PEA, e OEA) durante la seconda parte di entrambe le sessioni sperimentali (T70, T100, T130, e T190 vs. 60 min). Per confrontare le AUCs di ciascun



peptide o eCB è stato utilizzato il test t di Student in entrambe le sessioni sperimentali. Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato impiegato (per tutti i dati) per analizzare possibili correlazioni tra le variabili.

È stato scelto un valore di  $P < 0,05$  come statisticamente significativo.

# RISULTATI

## STUDIO I

*Effetto della velocità dell'assunzione di cibo sulla secrezione postprandiale di PYY e GLP-1 in adulti con sindrome di Prader-Willi;*

Le caratteristiche demografiche, cliniche, ormonali e metaboliche, in condizioni basali, dei soggetti dello studio sono riportate nella Tabella 1.

	Pazienti con PWS	Pazienti obesi	Soggetti normopeso
Età	35,8 ± 1,6	30,1 ± 3,2	29,8 ± 9,0
F/M	1/5	7/2	2/2
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	39,4 ± 3,1 <sup>a</sup>	44,1 ± 1,9 <sup>a</sup>	24,2 ± 3,0
GLP-1 (pM)	37,7 ± 8,6	18,0 ± 5,9	22,2 ± 2,0
PYY (pg/ml)	60,8 ± 5,1	90,3 ± 7,1	70,4 ± 11,9
Trigliceridi (mM)	4,5 ± 0,5	4,9 ± 0,3	4,8 ± 0,5
Insulina (pM)	41,8 ± 12,2	97,5 ± 40,5 <sup>a,b</sup>	49,1 ± 14,3
HOMA-IR	1,2 ± 0,1	3,1 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	1,5 ± 0,3

**Tab. 1:** Caratteristiche demografiche, cliniche, ormonali e metaboliche, in condizioni basali, dei soggetti dello studio.

<sup>a</sup>p < 0,05 vs soggetti normopeso

<sup>b</sup>p < 0,05 vs pazienti PWS

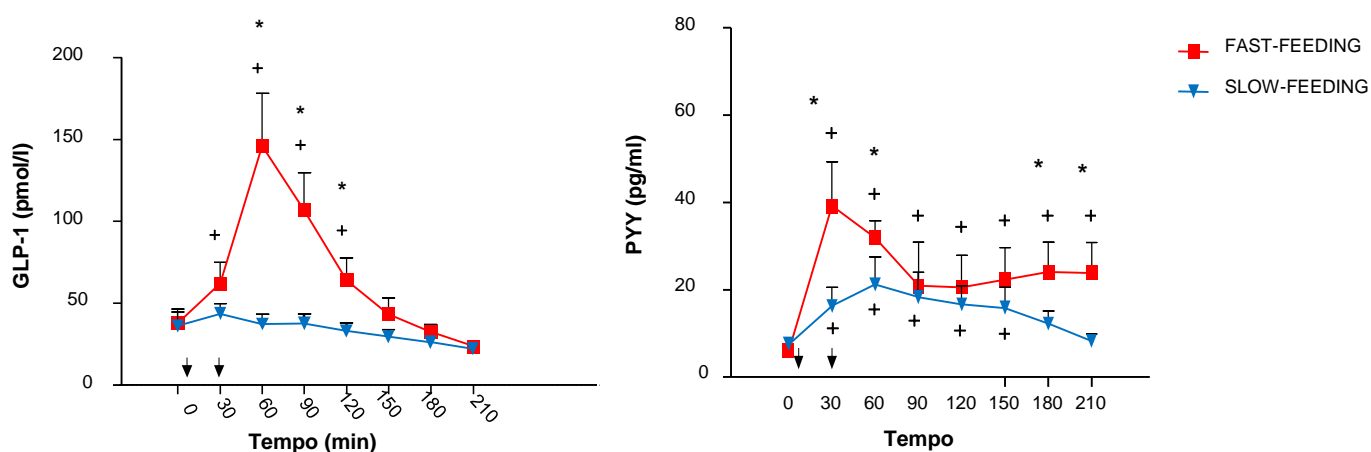
Nei soggetti normopeso il pasto aumentava significativamente le concentrazioni plasmatiche di GLP-1, a prescindere dalla velocità di assunzione del cibo (p<0,05 vs 0 min); nei pazienti con obesità semplice, l'assunzione di cibo (rapida o lenta che sia) non modificava significativamente i livelli plasmatici di GLP-1 (vs 0 min). Nei pazienti PWS, lo *slow feeding* non modificava significativamente i livelli plasmatici di GLP-1 mentre, il *fast feeding* aumentava significativamente la concentrazione plasmatica di GLP-1 (p<0,05 vs 0 min) (Fig. 12).

Come previsto, nei soggetti normopeso, le concentrazioni plasmatiche di GLP-1 erano più elevate in seguito a *slow feeding*, rispetto al *fast feeding*, a 90 e 120 min dopo l'assunzione del pasto (p<0,05); nei pazienti obesi, l'andamento dei

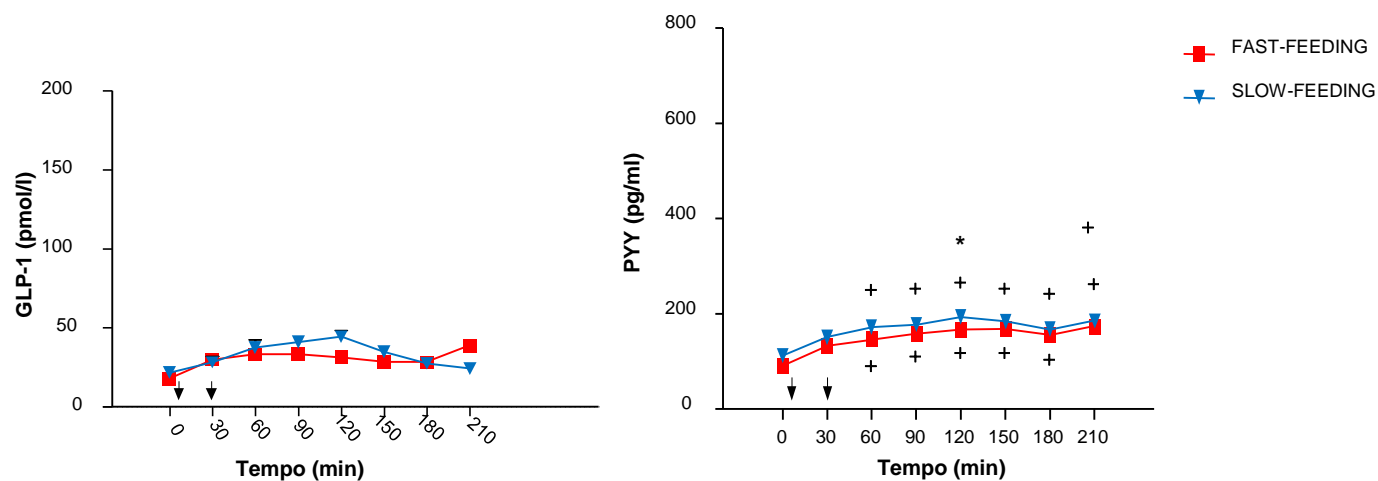
livelli plasmatici di GLP-1 era pressoché lo stesso in tutti i tempi del *fast feeding* e dello *slow feeding*. Nei pazienti PWS le concentrazioni plasmatiche di GLP-1 erano più alte dopo *fast feeding*, rispetto allo *slow feeding*, a 60, 90 e 120 min dopo il pasto (Fig. 12).

Indipendentemente dalla velocità di assunzione del pasto, i livelli plasmatici di PYY aumentavano significativamente in tutti i gruppi ( $p < 0,05$  vs 0 min) (Fig.12). Quando i soggetti normopeso eseguivano lo *slow feeding*, i livelli plasmatici di PYY erano significativamente maggiori rispetto ai valori rilevati in seguito a *fast feeding* a 30, 90, 120, 150, e 210 min. Nei pazienti obesi era presente una differenza statisticamente significativa solo a 120 min. Quando i pazienti PWS eseguivano il *fast feeding*, i livelli plasmatici di PYY erano significativamente maggiori dei valori misurati dopo *slow feeding* a 30, 60, 180 e 210 min (Fig. 12).

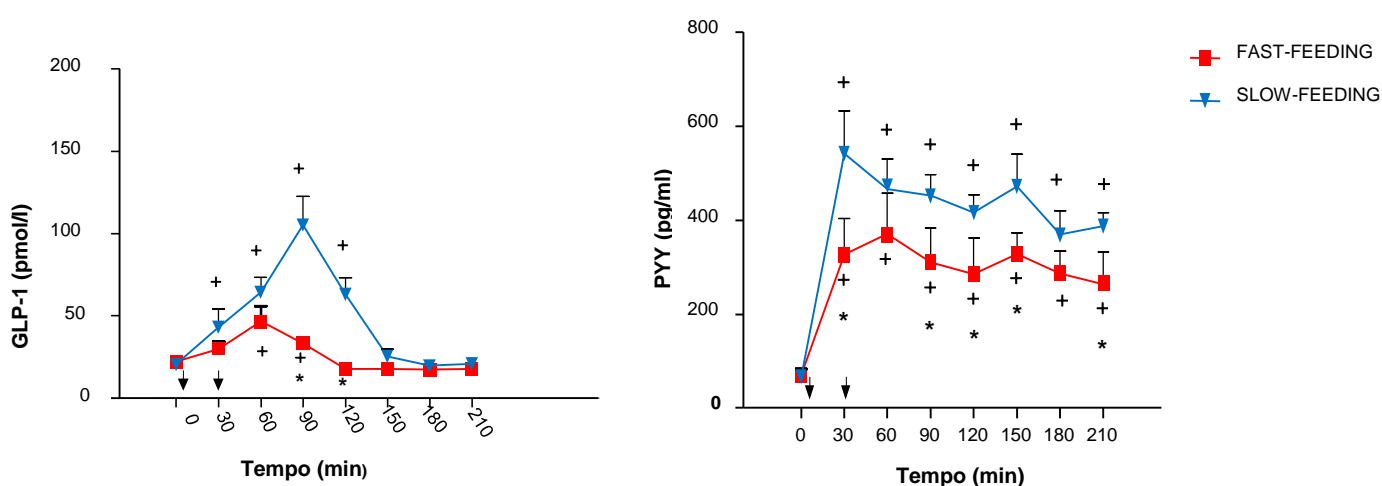
### Pazienti PWS



### Pazienti OBESI

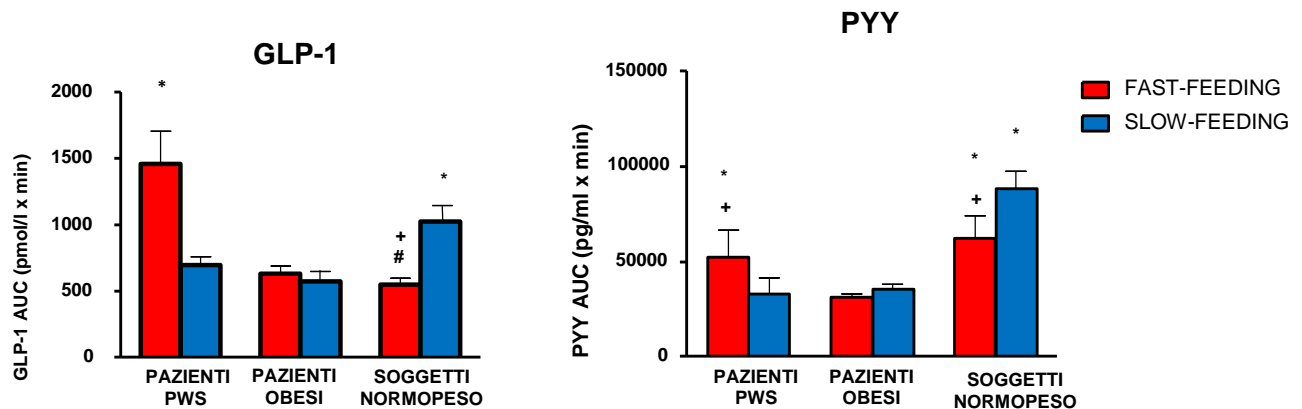


### Soggetti NORMOPESO



**Fig. 12:** Concentrazioni plasmatiche di GLP-1 e PYY dopo un pasto di 10 Kcal/Kg assunto in 5 min (*fast feeding*) o in 30 min (*slow feeding*) da soggetti normopeso, pazienti affetti da obesità semplice e pazienti PWS. Entrambi i pasti ebbero inizio al tempo 0 min; le frecce indicano la fine del pasto. Valori espressi come media $\pm$ SEM. \*P<0,05 vs il corrispondente punto nello *slow feeding*; \*P<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.

Nei soggetti normopeso le AUCs per le risposte di GLP-1 e PYY dopo 210 min erano significativamente maggiori dopo *slow feeding*, rispetto al *fast feeding*, mentre nei pazienti PWS si osservava una tendenza inversa, con le AUCs per le risposte di GLP-1 e PYY dopo 210 min significativamente maggiori dopo *fast feeding* rispetto allo *slow feeding*; nei pazienti obesi, le AUCs per le risposte di GLP-1 e PYY dopo 210 min, non erano influenzate dalla velocità di assunzione del cibo. Inoltre, *slow feeding* e *fast feeding* inducevano risposte di GLP-1 e PYY significativamente maggiori nei soggetti normopeso e nei pazienti PWS, rispetto ai pazienti obesi. Infine, il *fast feeding* induceva una risposta di GLP-1 significativamente maggiore nei pazienti PWS, rispetto ai soggetti normopeso (Fig. 13).



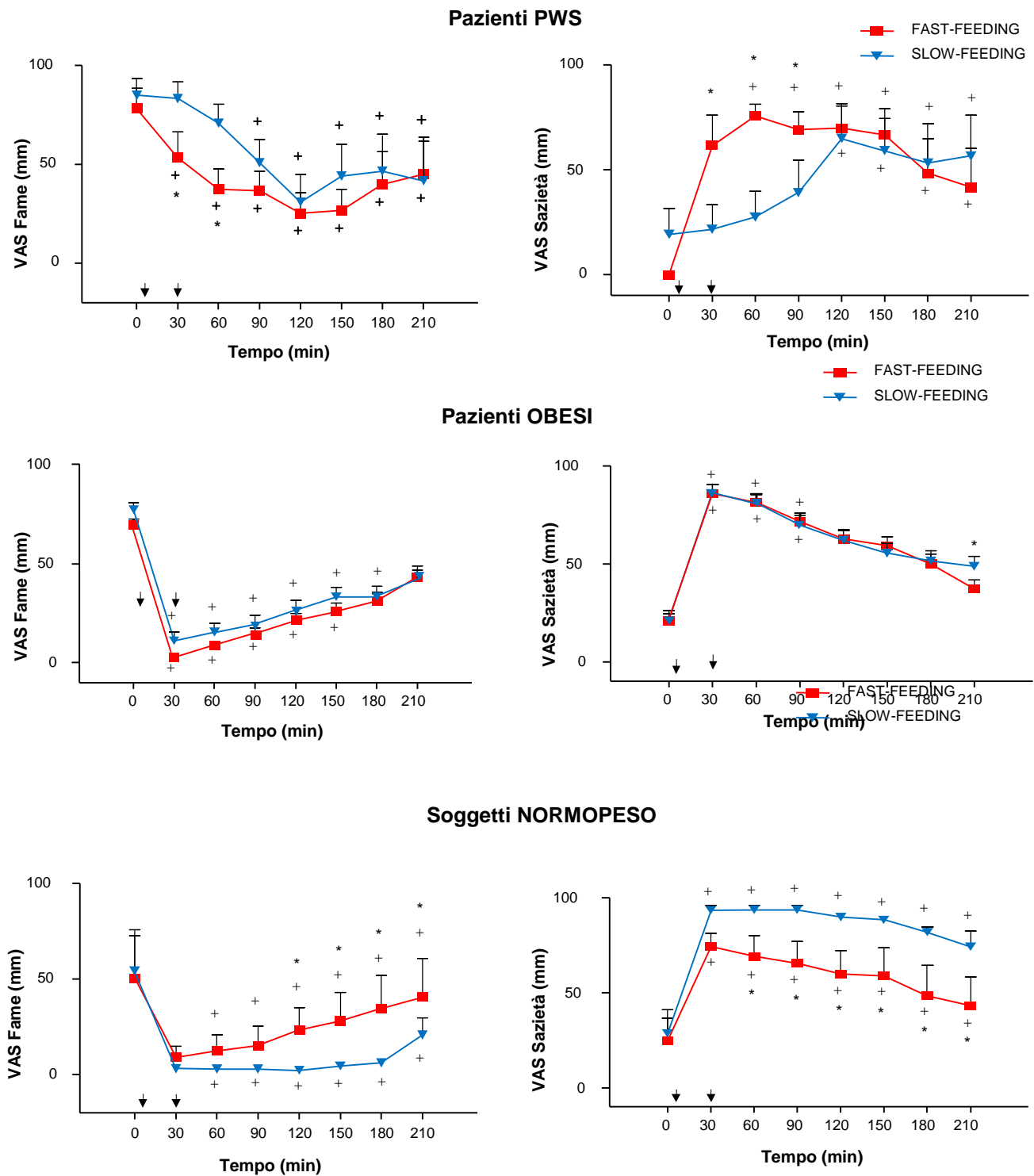
**Fig. 13:** AUCs dopo 210 min per le concentrazioni plasmatiche di GLP-1 e PYY in pazienti PWS, pazienti affetti da obesità semplice e soggetti normopeso, in seguito a un pasto di 10 Kcal/Kg assunto a velocità differenti (*fast feeding* vs *slow feeding*). Valori espressi come media $\pm$ SEM. \*P<0,05 vs pazienti obesi dopo *slow* e *fast feeding*; +P<0,05 vs il corrispondente valore dopo *slow feeding*; #P<0,05 vs il corrispondente valore nel gruppo di pazienti PWS.

Indipendentemente dalla velocità di assunzione del cibo, si osservava una diminuzione significativa della fame e un aumento significativo della sazietà, nei punteggi delle VASs, dopo l'assunzione di cibo in tutti i gruppi (p<0,05 vs 0 min) (Fig. 14).

Come atteso, nei soggetti normopeso il punteggio relativo alla fame nelle VASs era significativamente minore dopo 120, 150, 180 e 210 min nello *slow feeding*, rispetto a quanto registrato dopo *fast feeding* (Fig. 14), mentre non si osservava differenza alcuna nei dati rilevati nei pazienti obesi. Nei pazienti PWS, il punteggio relativo alla fame nelle VASs era significativamente minore a 30 e 60 min nella sessione di *fast feeding*, rispetto a quelli registrati nella sessione di *slow feeding* (Fig. 14).

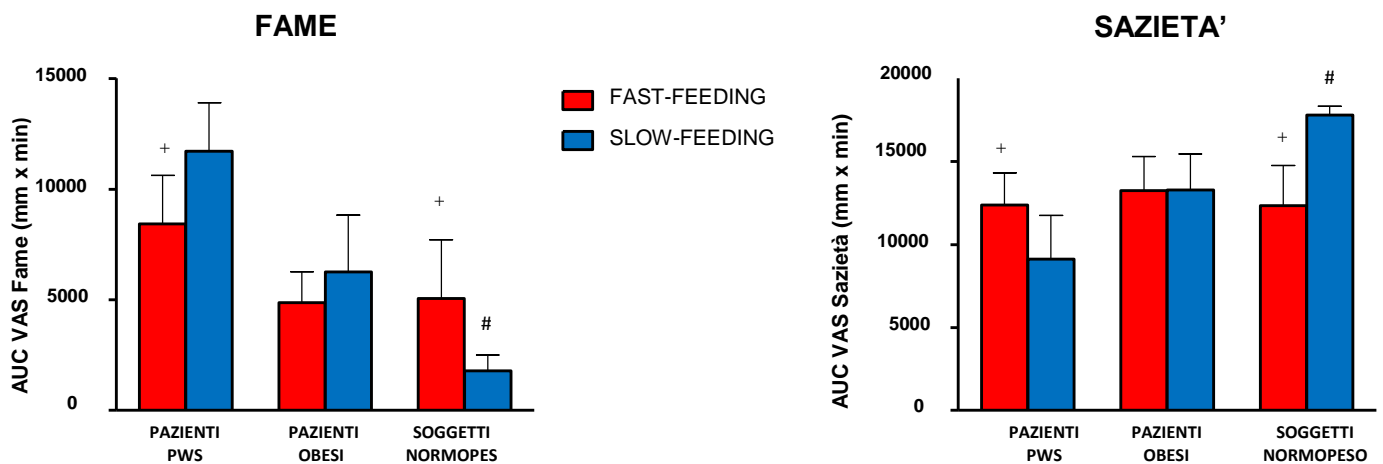
Come previsto, nei soggetti normopeso il punteggio relativo alla sazietà nelle VASs era maggiore durante lo *slow feeding*, rispetto al *fast feeding*, da 60 min fino alla

fine della sessione (210 min); nei pazienti obesi è stato rilevato, dai punteggi delle VASs relative alla sazietà, lo stesso aumento a tutti i tempi sia nella sessione di *fast feeding* che in quella di *slow feeding*. Nei pazienti PWS il punteggio delle VASs relative alla sazietà era maggiore dopo il *fast feeding*, rispetto allo *slow feeding*, ai tempi 30, 60 e 90 min (Fig. 14).



**Fig. 14:** Andamento dei punteggi delle VASs della fame e della sazietà dopo un pasto di 10 Kcal/Kg assunto in 5 min (*fast feeding*) o in 30 min (*slow feeding*) da soggetti normopeso, pazienti affetti da obesità semplice e pazienti PWS. Entrambi i pasti ebbero inizio al tempo 0 min; le frecce indicano la fine del pasto. Valori espressi come media±SEM. \*P<0,05 vs il corrispondente punto nello *slow feeding*; +P<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.

In contrasto ai pazienti obesi, nei soggetti normopeso le AUCs per i punteggi di fame delle VASs, nei 210 min, erano significativamente minori dopo il *fast feeding* e quelle relative alla sazietà erano significativamente maggiori dopo lo *slow feeding*. In aggiunta, lo *slow feeding* induceva valori di AUCs per i punteggi di fame delle VASs nei 210 min, significativamente minori nei soggetti normopeso rispetto ai pazienti PWS. Infine, lo *slow feeding* induceva valori di AUCs per i punteggi di sazietà delle VASs nei 210 min significativamente maggiori nei soggetti normopeso, rispetto ai pazienti PWS. Le AUCs dei punteggi nelle VASs della fame e della sazietà nei 210 min risultavano maggiori e minori, rispettivamente, dopo *slow feeding* in PWS rispetto ai pazienti obesi, pur non essendo differenze statisticamente significative (Fig. 15).

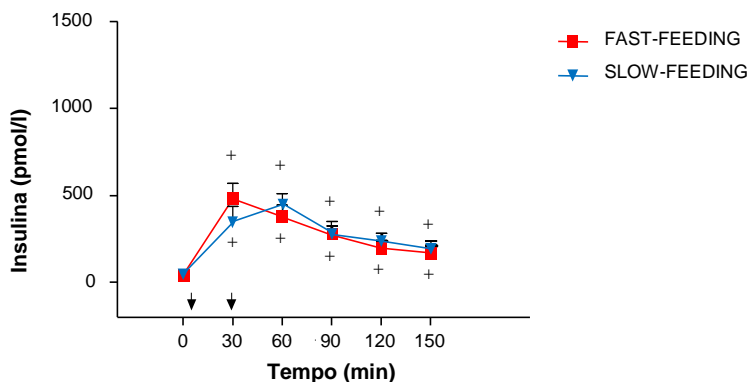
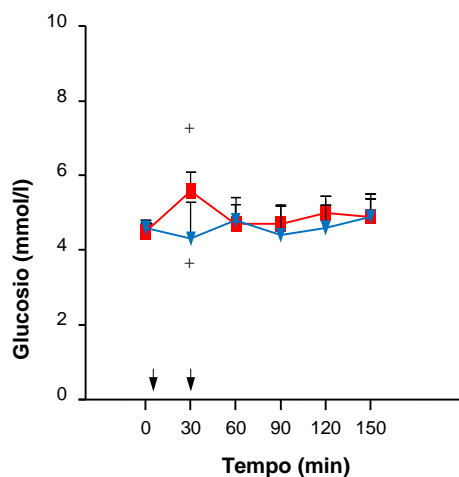


**Fig. 15:** AUCs dopo 210 min per i punteggi delle VASs di fame e sazietà in pazienti PWS, pazienti affetti da obesità semplice e soggetti normopeso, in seguito a un pasto di 10 Kcal/Kg assunto a velocità differenti (*fast feeding* vs *slow feeding*). Valori espressi come media $\pm$ SEM. \*P<0,05 vs pazienti obesi dopo *slow* e *fast feeding*; +P<0,05 vs il corrispondente valore dopo *slow feeding*; #P<0,05 vs il corrispondente valore nel gruppo di pazienti PWS.

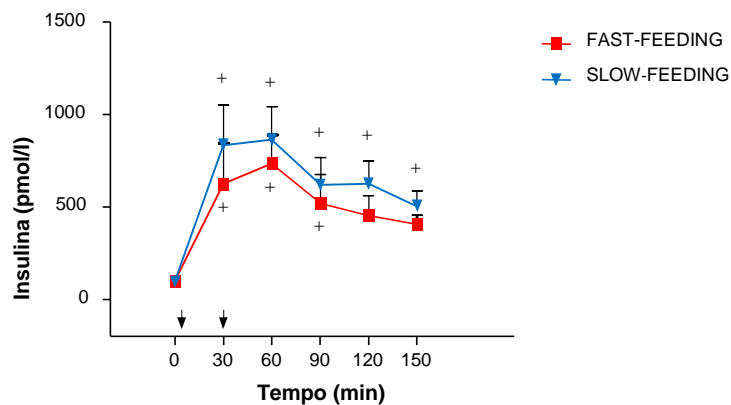
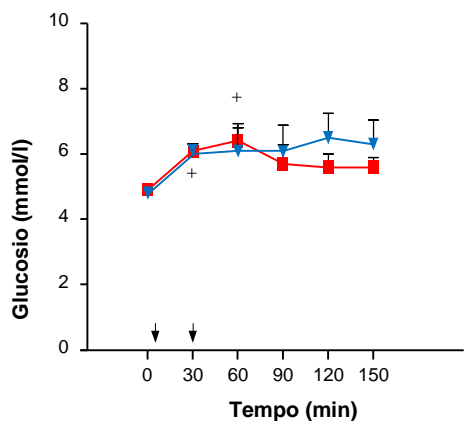
Indipendentemente dalla quantità di cibo ingerito, dopo il pasto tutti i gruppi hanno mostrato aumenti significativi dei livelli di glucosio e d'insulina. Al contrario, i livelli di trigliceridi erano notevolmente aumentati solo nei soggetti normopeso. I livelli di glucosio, insulina e trigliceridi aumentavano dopo il *fast feeding* e lo *slow feeding* in modo paragonabile in tutti i gruppi, a eccezione della glicemia a 60 min nei soggetti normopeso (Fig. 16 e Fig. 17). Le AUCs dell'insulina e dei trigliceridi nei 150 min erano significativamente maggiori nei pazienti obesi rispetto agli altri due gruppi quando sottoposti a mangiare lentamente o velocemente (Fig. 18).



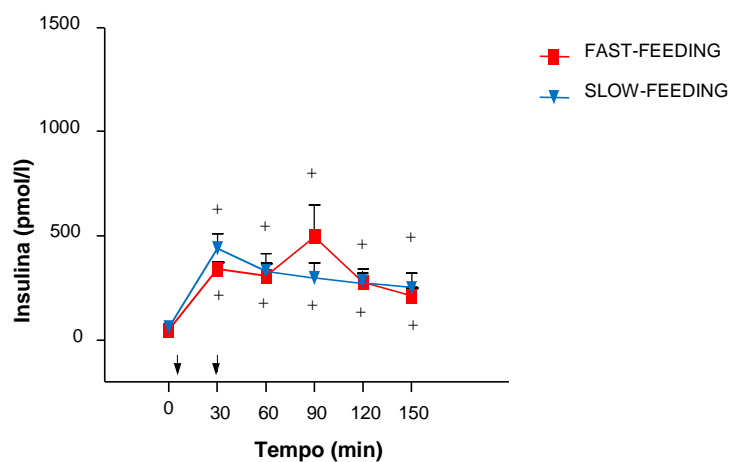
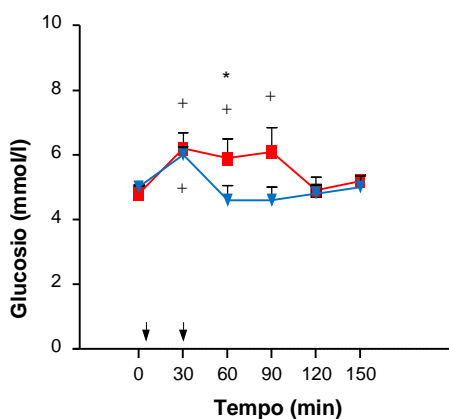
### Pazienti PWS



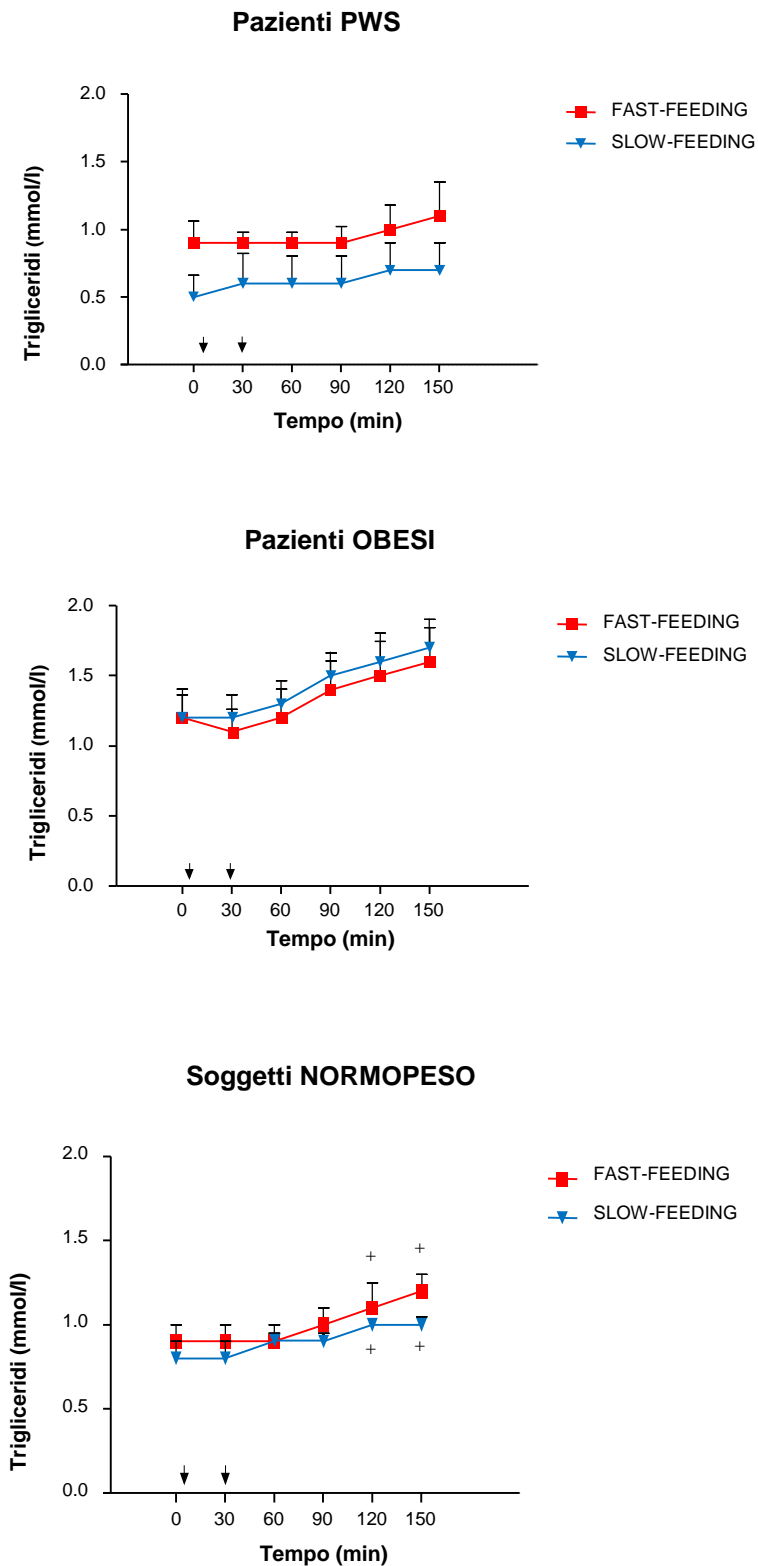
### Pazienti OBESI



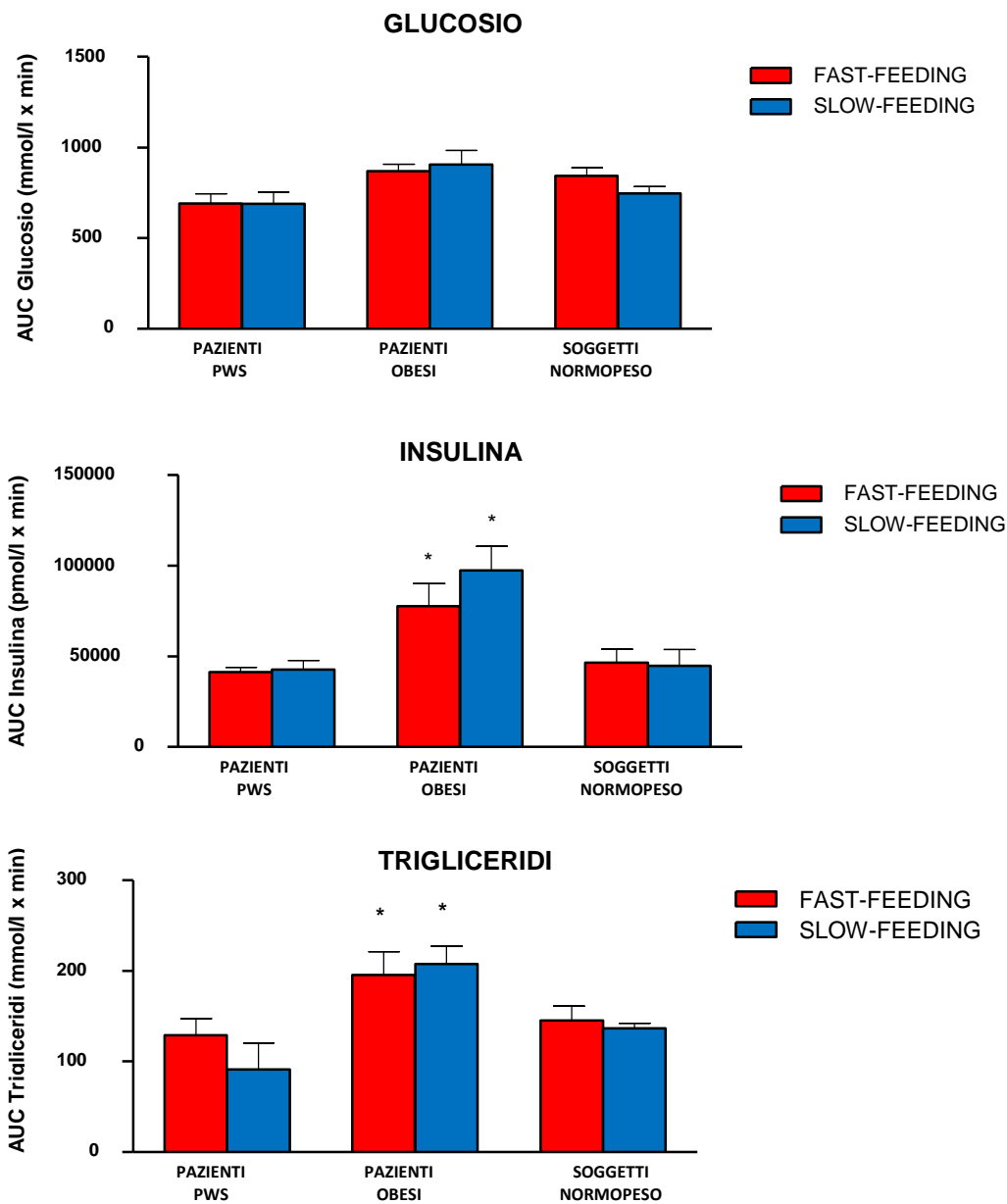
### Soggetti NORMOPESO



**Fig. 16:** Concentrazioni sieriche di glucosio e insulina dopo un pasto di 10 Kcal/Kg assunto in 5 min (*fast feeding*) o in 30 min (*slow feeding*) da soggetti normopeso, pazienti affetti da obesità semplice e pazienti PWS. Entrambi i pasti ebbero inizio al tempo 0 min; le frecce indicano la fine del pasto. Valori espressi come media $\pm$ SEM. \*P<0,05 vs il corrispondente punto nello *slow feeding*; \*P<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.



**Fig. 17:** Concentrazioni sieriche di trigliceridi dopo un pasto di 10 Kcal/Kg assunto in 5 min (*fast feeding*) o in 30 min (*slow feeding*) da soggetti normopeso, pazienti affetti da obesità semplice e pazienti PWS. Entrambi i pasti ebbero inizio al tempo 0 min; le frecce indicano la fine del pasto. Valori espressi come media±SEM. \*P<0,05 vs il corrispondente punto nello *slow feeding*; +P<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.



**Fig. 18:** Valori di AUCs dopo 150 min per i livelli di glucosio, insulina e trigliceridi in i pazienti PWS, pazienti con obesità semplice e soggetti normopeso, dopo un pasto di 10 Kcal/Kg assunto a velocità differenti (in 5 min per il *fast feeding* o 30 min per lo *slow feeding*). Valori riportati come media±SEM. \*P<0,05 vs soggetti normopeso o pazienti PWS dopo fast e *slow feeding*.

## **STUDIO II**

*Effetto della velocità dell'assunzione di cibo sulla secrezione postprandiale di PYY e GLP-1 in adulti obesi prima e dopo essere stati sottoposti all'intervento di sleeve gastrectomy in laparoscopia*

Le caratteristiche demografiche, cliniche, ormonali e metaboliche, in condizioni basali e a seguito di LSG dei soggetti dello studio sono riportate nella Tabella 2. Il peso corporeo, BMI, la circonferenza vita, i livelli plasmatici di insulina e HOMA-IR risultavano significativamente ridotti a 3 mesi dall'intervento.

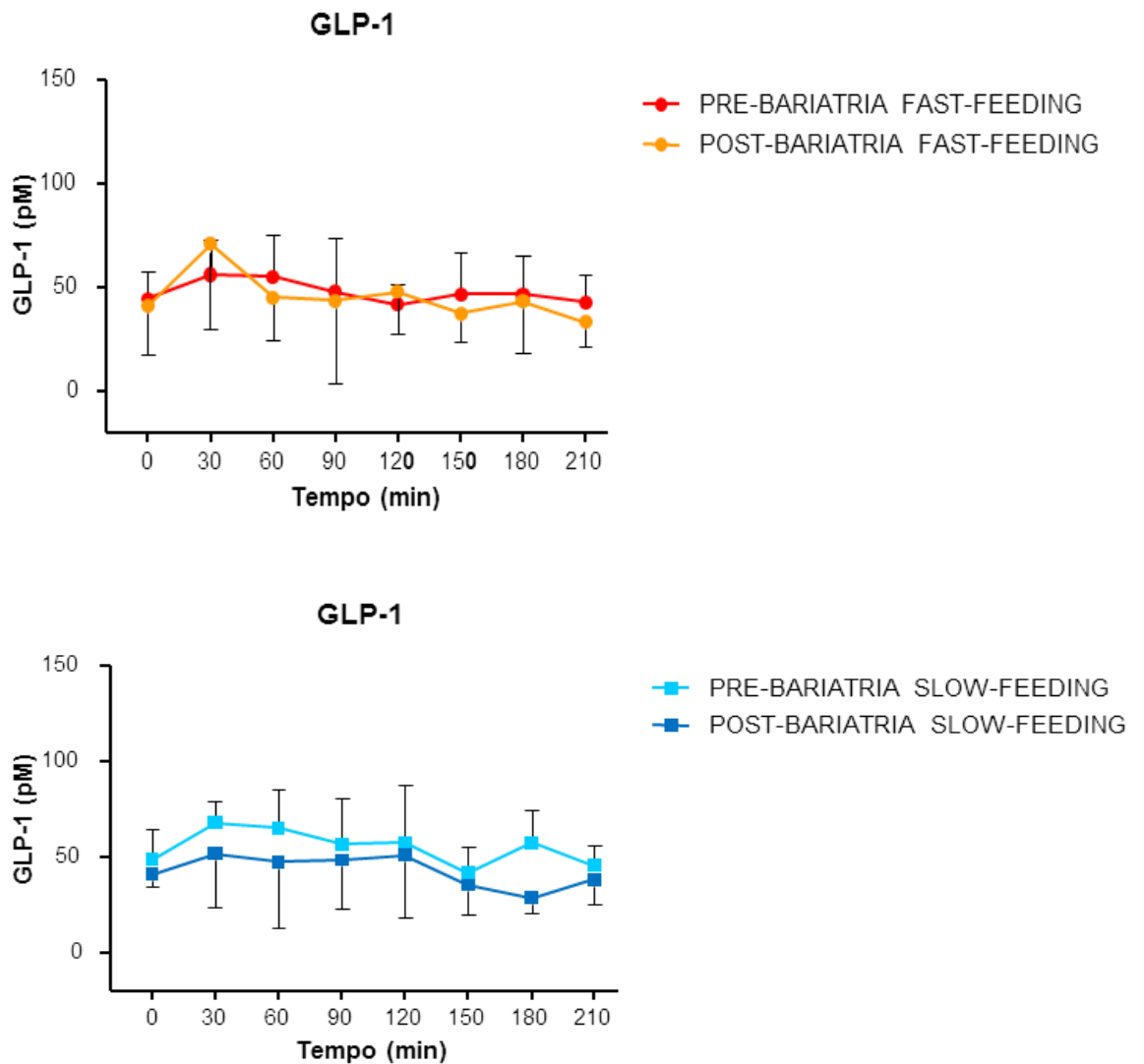
	Pre-LSG	Post-LSG
Numero (n.)	10	10
F/M	6/4	6/4
Età	38,8 ± 12,0	38,8 ± 12,0
Peso (kg)	129,3 ± 32,6	109,7 ± 28,7*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	46,0 ± 7,2	36,5 ± 13,1*
Circonferenza vita (cm)	129,2 ± 21,0	111,9 ± 18,0*
Glucosio (mg/dl)	91,5 ± 10,0	92,4 ± 6,2
Insulina (µIU/ml)	28,4 ± 13,4	10,6 ± 4,7*
HOMA-IR	6,6 ± 3,6	2,6 ± 1,2*
Trigliceridi (mg/dl)	133,1 ± 107,7	101,0 ± 46,2
PYY (pg/ml)	148,1 ± 29,3	113,4 ± 31,0
GLP-1 (pM)	44,5 ± 12,9	40,9 ± 23,6

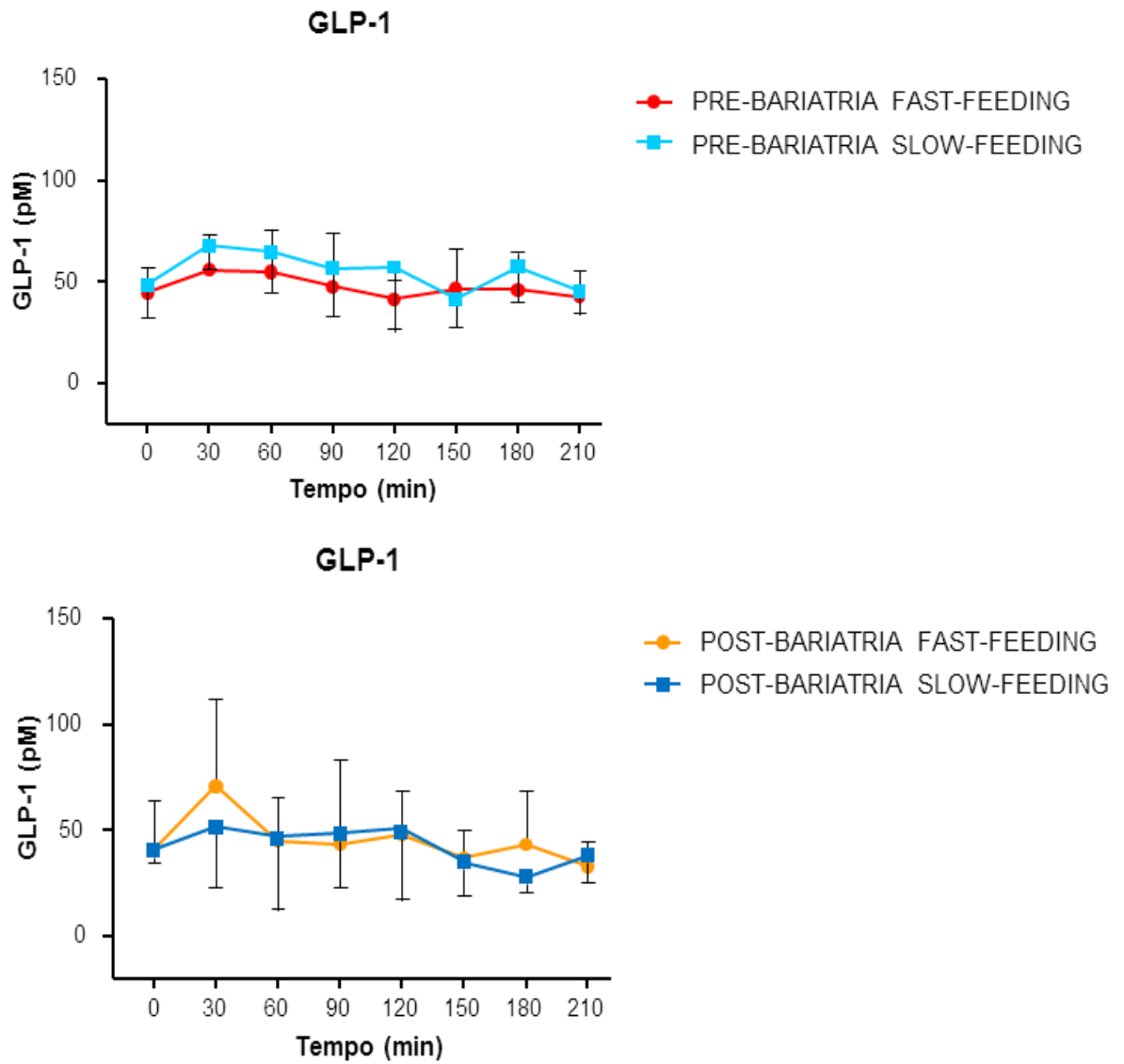
**Tab. 2:** caratteristiche demografiche, cliniche, ormonali e metaboliche, dei soggetti dello studio prima e dopo LSG.

\*p < 0,05 vs pre-LSG

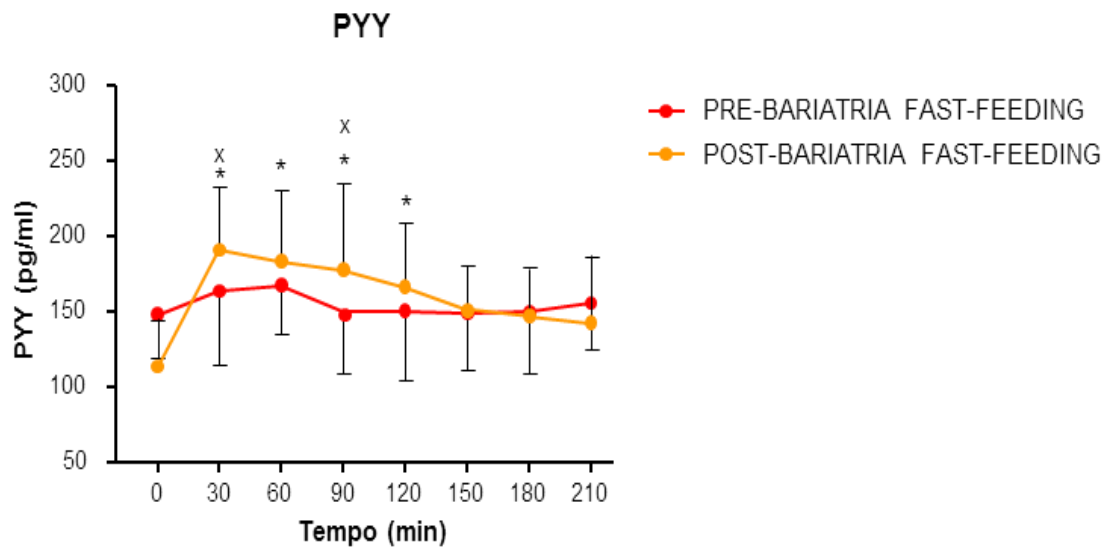
Prima e dopo LSG, nei pazienti obesi l'assunzione di cibo ad entrambe le velocità non modificava significativamente i livelli plasmatici di GLP-1 (vs 0 min) (Fig. 19). Durante la fase pre-LSG, i livelli plasmatici di PYY non variavano in maniera significativa (vs 0 min) quando i pazienti obesi assumevano il pasto in 5 o 30 min (Fig. 20). Contrariamente, in fase post-LSG, i livelli plasmatici di PYY aumentavano in maniera significativa a seguito dell'assunzione del pasto in tutti i gruppi (*fast* e *slow feeding*: 30, 60, 90 e 120 min; p<0,05 vs 0 min) (Fig.19). Indipendentemente

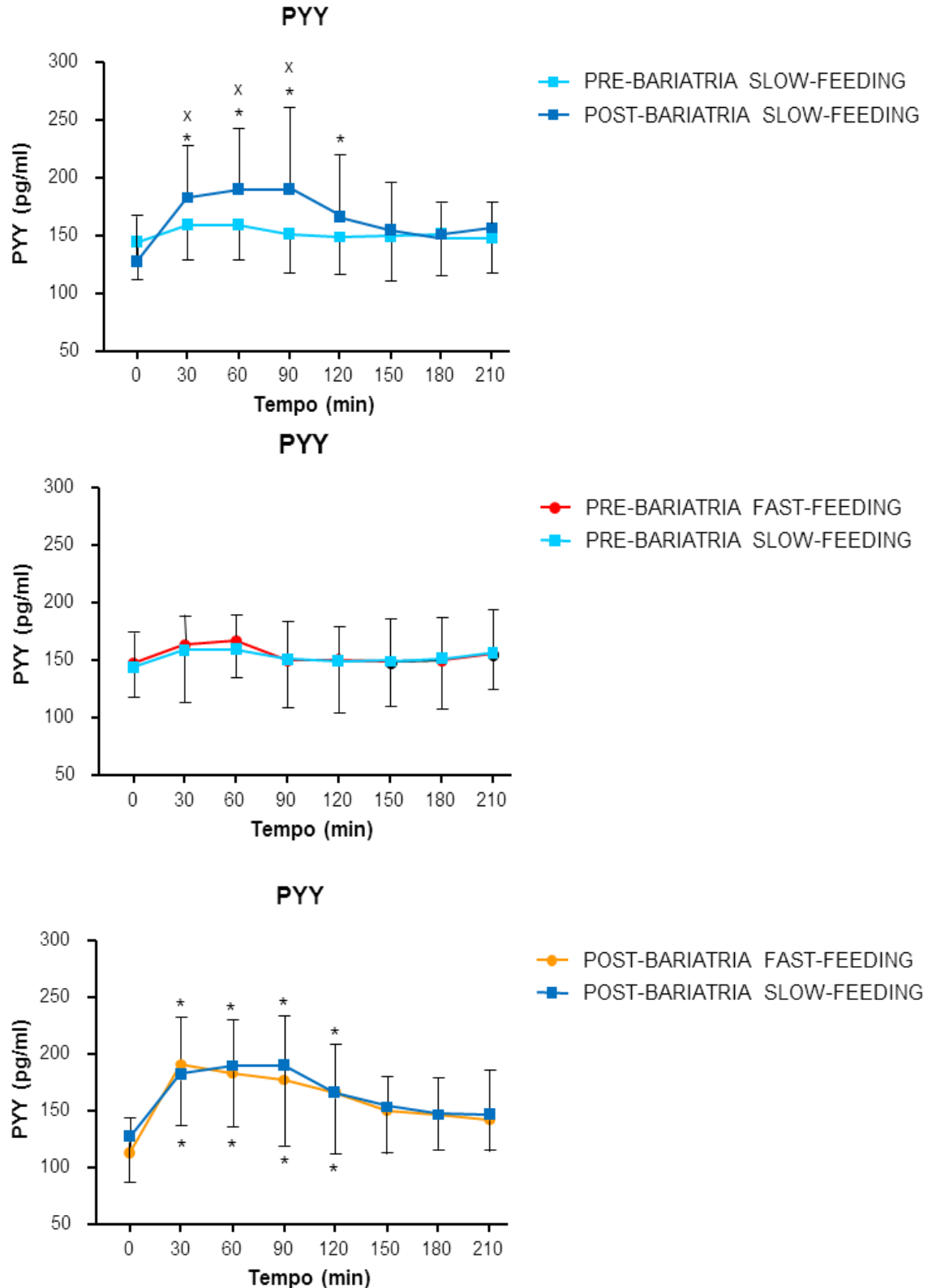
dalla velocità di assunzione del pasto (*fast* o *slow feeding*), i livelli plasmatici di GLP-1 non differivano in maniera significativa quando i due contesti clinici (fase pre- e post-LSG) venivano confrontati (Fig. 19). In contrasto, LSG determinava un aumento significativo dei livelli plasmatici di PYY nei pazienti obesi a seguito di *fast* o *slow feeding* rispetto ai livelli riscontrati nei gruppi corrispondenti in fase pre-LSG (*fast feeding*: 30 e 90 min; *slow feeding*: 30, 60 e 90 min;  $p < 0,05$  vs il corrispondente punto temporale pre-LSG) (Fig.20). Nessuna differenza significativa veniva evidenziata tra i livelli plasmatici di GLP-1 e PYY in fase pre- o post-LSG quando venivano confrontate le due diverse velocità di assunzione del pasto (Fig.19 e Fig. 20).





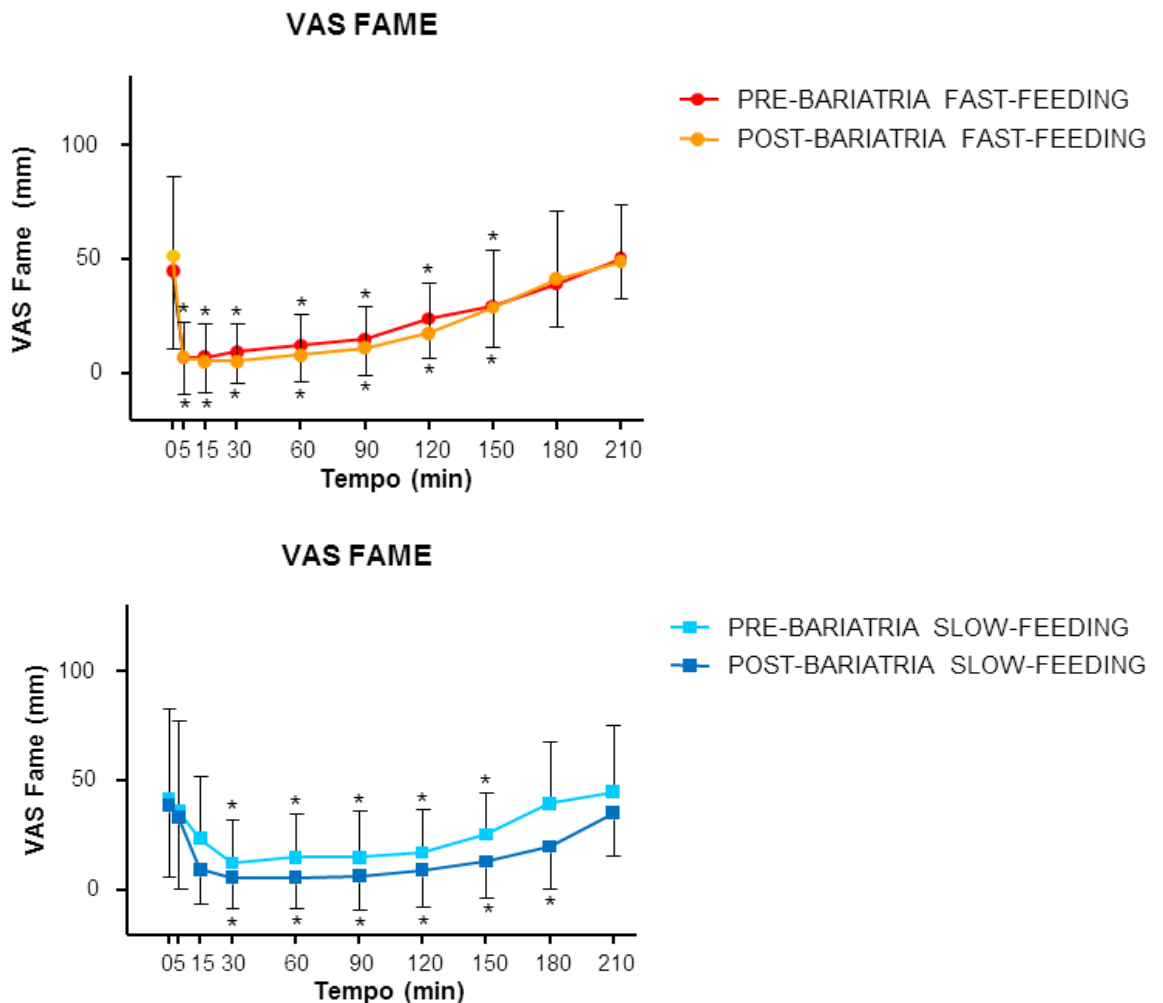
**Fig. 19:** Concentrazioni plasmatiche di GLP-1 dopo l'assunzione di un pasto di 10 kcal/kg in 5 min (*fast feeding*) o 30 min (*slow feeding*) in pazienti obesi prima e dopo LSG. Entrambi i pasti sono stati somministrati a partire dal tempo 0 min. Valori espressi come media±SEM. I quattro profili delle concentrazioni plasmatiche di GLP-1 sono stati rappresentati in riquadri differenti per facilitare la comprensione dei diversi confronti (*fast feeding*, *slow feeding*, pre-LSG e post-LSG)



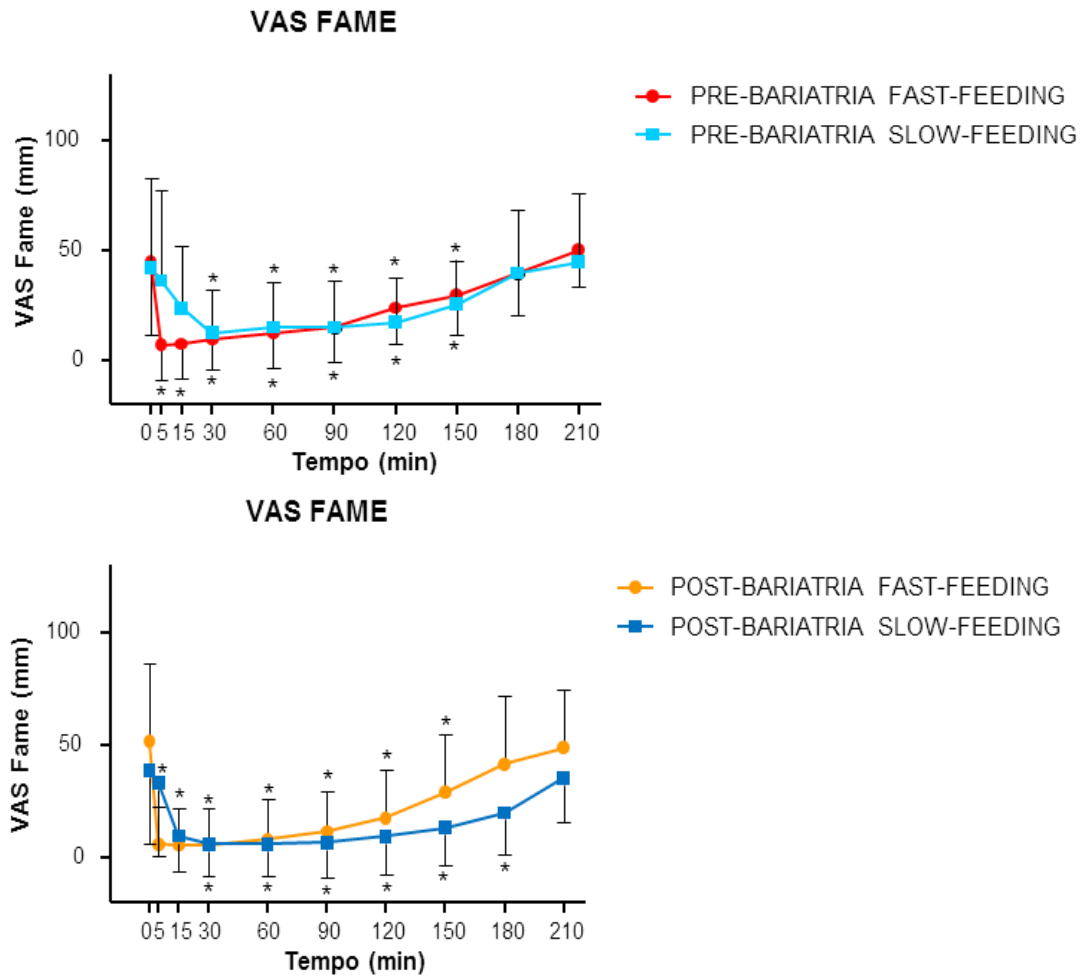


**Fig. 20:** Concentrazioni plasmatiche di PYY dopo l'assunzione di un pasto di 10 kcal/kg in 5 min (*fast feeding*) o 30 min (*slow feeding*) in pazienti obesi prima e dopo LSG. Entrambi i pasti sono stati somministrati a partire dal tempo 0 min. Valori espressi come media±SEM. \*p<0,05 vs il corrispondente punto della fase pre-LSG; \*p<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min. I quattro profili delle concentrazioni plasmatiche di PYY sono stati rappresentati in riquadri differenti per facilitare la comprensione dei diversi confronti (*fast feeding*, *slow feeding*, pre-LSG e post-LSG).

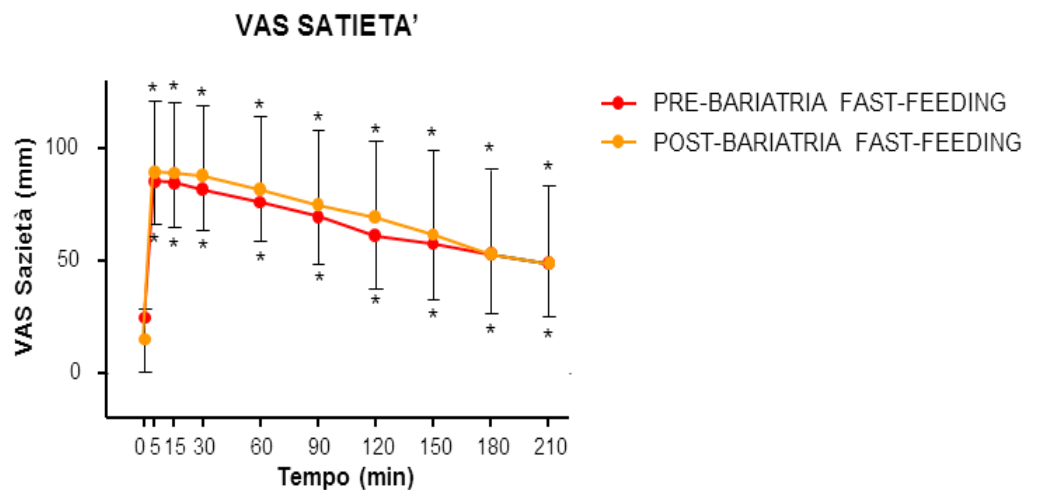
Indipendentemente dalla velocità di assunzione del pasto, si osservava una diminuzione e un aumento del punteggio delle VASs, rispettivamente, relative al senso di fame e di sazietà in entrambe le fasi pre- e post-LSG (VAS fame pre-LSG: 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 min per *fast feeding* e 30, 60, 90, 120, 150 min per *slow feeding*; VAS fame post-LSG: 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 min per *fast feeding* e 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min per *slow feeding*; VAS sazietà pre-LSG: tutti i punti per *fast feeding* e a 30, 60, 90 e 120 min per *slow feeding*; VAS sazietà post-LSG: a tutti i punti per *fast feeding* e a 30, 60, 90, 120 e 150 min per *slow feeding*;  $p < 0.05$  vs. 0 min) (Fig. 21, Fig. 22). Quando venivano confrontate le due diverse velocità di assunzione del pasto (*fast* e *slow feeding*), si osservavano le stesse riduzioni nel punteggio delle VASs relative alla fame per le fasi pre- o post-LSG (Fig. 21). Quando *fast* e *slow feeding* venivano confrontate, il punteggio delle VASs relative alla sazietà era significativamente maggiore quando i pazienti obesi assumevano il pasto velocemente durante la fase pre- o post-LSG (pre- e post-LSG: a 5 e 15 min;  $p < 0.05$  vs. il punto corrispondente nello *slow feeding*) (Fig. 22).

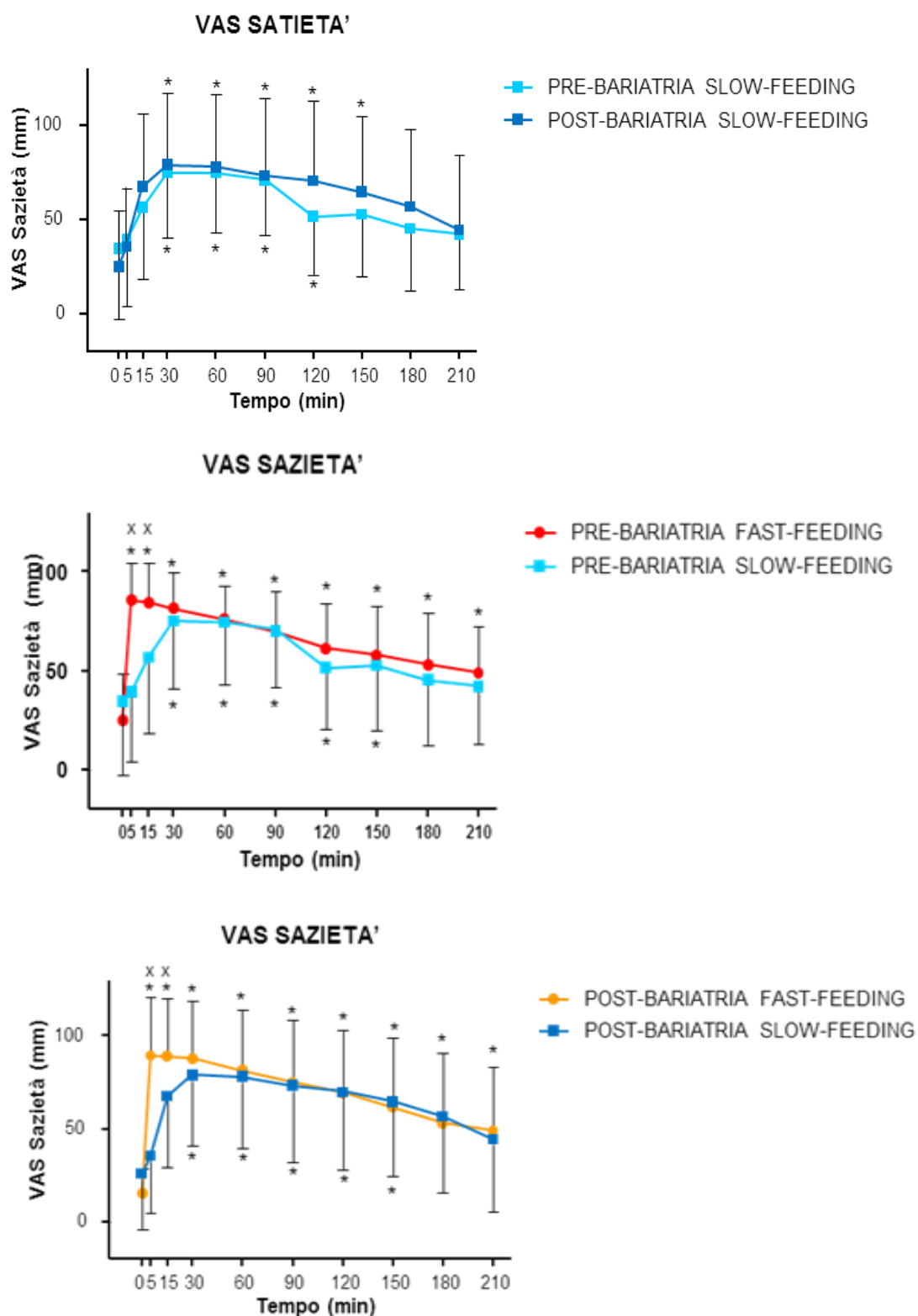






**Fig. 21:** Profilo temporale dei punteggi delle VASs della fame dopo un pasto di 10 kcal/kg assunto in 5 min (*fast feeding*) o in 30 min (*slow feeding*) da pazienti obesi prima e dopo LSG. Entrambi I pasti sono stati somministrati a partire dal tempo 0 min. Valori espressi come media±SEM. \*p<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.



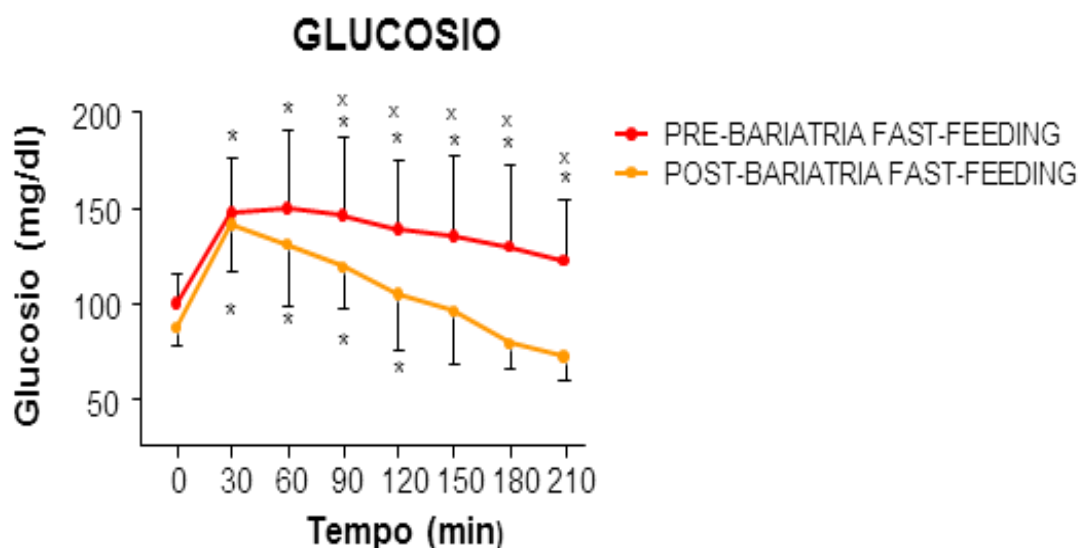


**Fig. 22:** Profilo temporale dei punteggi delle VASs della sazietà dopo un pasto di 10 kcal/kg assunto in 5 min (*fast feeding*) o in 30 min (*slow feeding*) da pazienti obesi prima e dopo LSG. Entrambi I pasti sono stati somministrati a partire dal tempo 0 min. Valori espressi come media $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente punto nello *slow feeding*; \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.

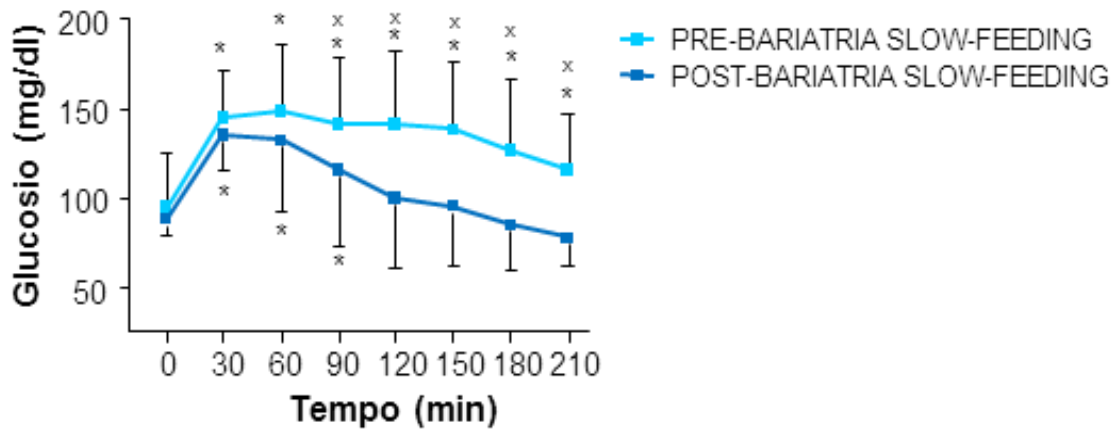
Indipendentemente dalla velocità di assunzione del pasto (*fast* e *slow feeding*) e dal contesto clinico (fase pre- e post-LSG), dopo il pasto sono stati misurati aumenti significativi di glucosio e insulina, mentre i livelli post-prandiali dei trigliceridi non differivano in maniera significativa (glucosio pre-LSG: a tutti i punti per *fast* e *slow feeding*; glucosio post-LSG: a 30, 60, 90 e 120 min per *fast feeding* e a 30, 60 e 90 min per *slow feeding*; insulina pre-LSG: a tutti i punti per *fast* e *slow feeding*; insulina post-LSG: a 30, 60, 90 e 120 min per *fast* e *slow feeding*;  $p < 0,05$  vs. 0 min) (Fig. 23).

Nei pazienti sottoposti a LSG, a seguito di assunzione rapida o lenta del pasto, si evidenziava un miglioramento dell'insulino-resistenza, evidenziato dalle significative riduzioni dei livelli di glucosio e insulina (glucosio: a 90, 120, 150, 180 e 210 min per *fast feeding*;  $p < 0.05$  vs il punto corrispondente nel gruppo pre-LSG) (Fig. 23).

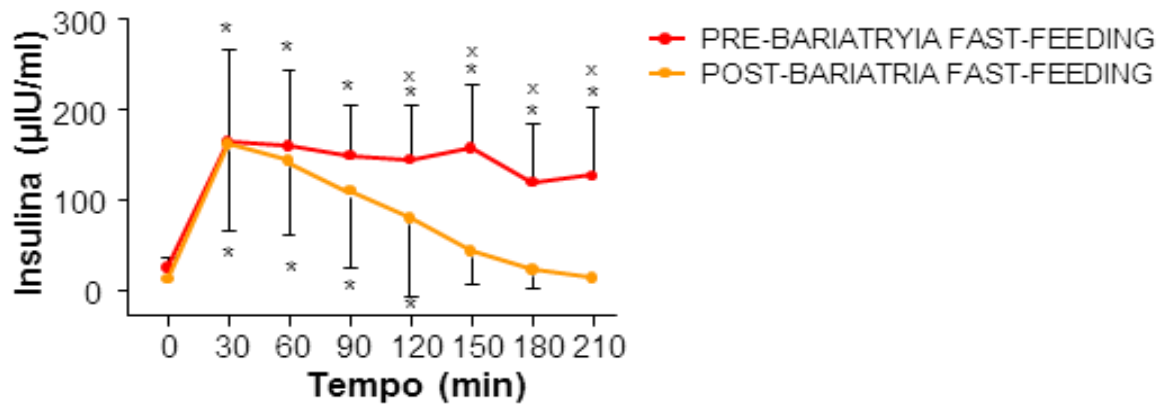
Il confronto dei livelli sierici di glucosio, insulina e trigliceridi nello stesso contesto clinico (pre-LSG o post-LSG) non evidenziava differenze significative a seguito dell'assunzione veloce o lenta del pasto (Fig. 23)



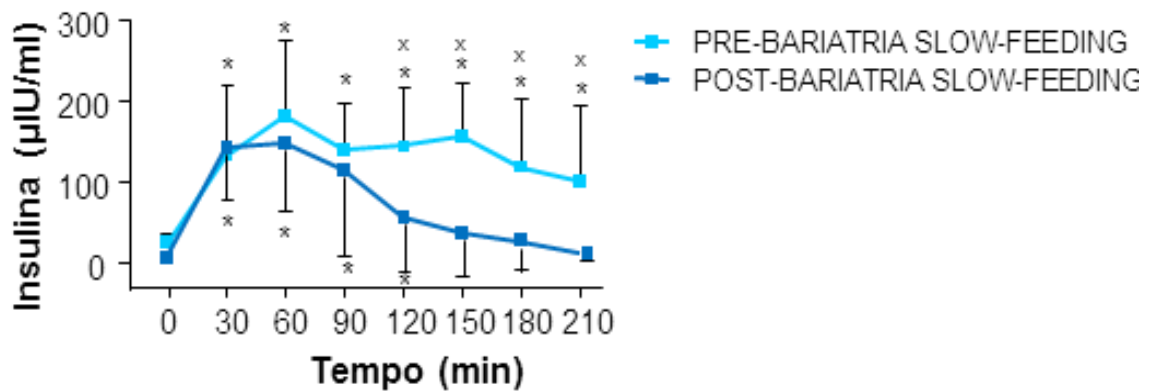
### GLUCOSIO

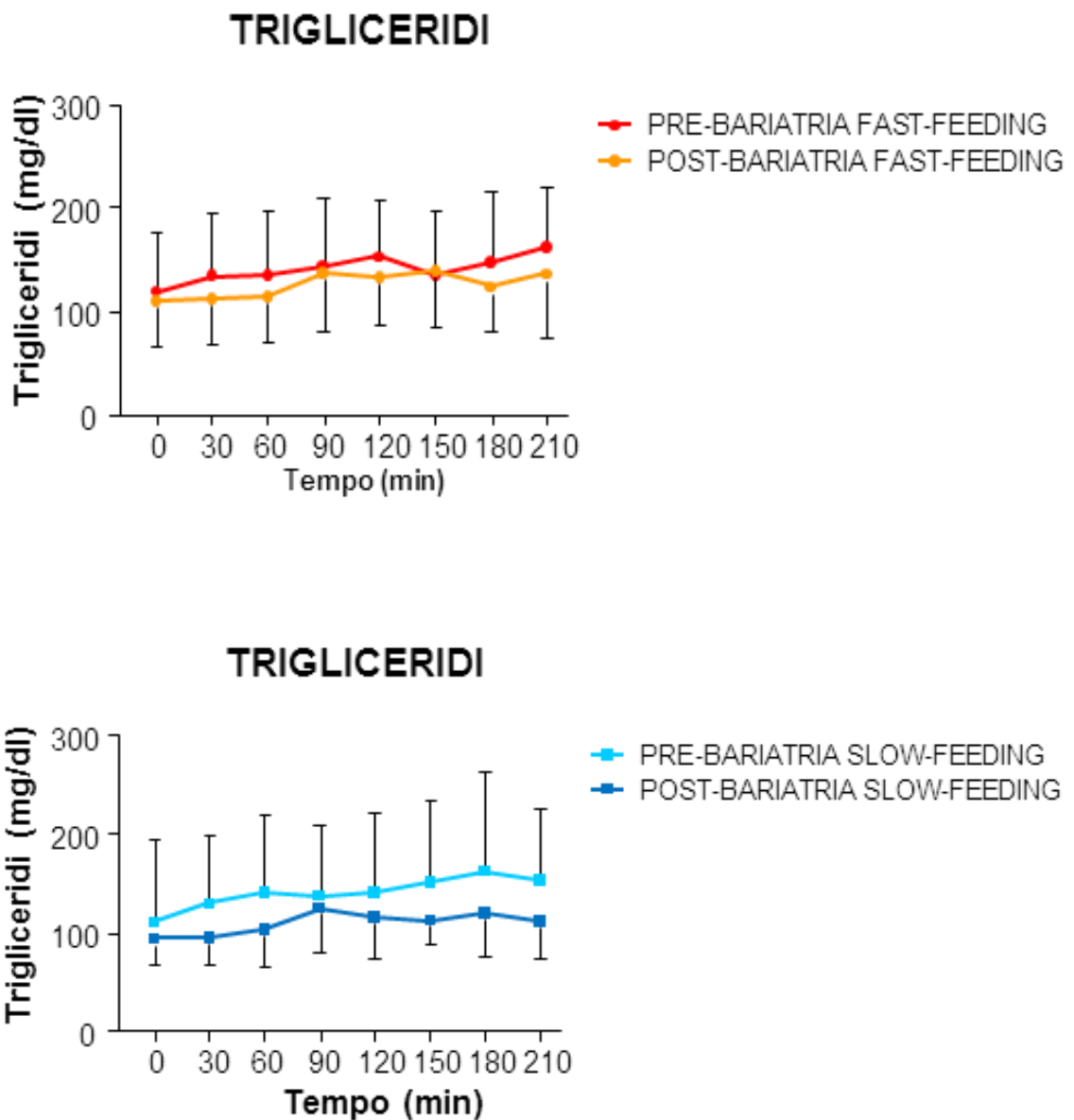


### INSULINA



### INSULINA





**Fig. 23:** Concentrazioni sieriche di glucosio, insulina e trigliceridi dopo un pasto di 10 kcal/kg assunto in 5 min (fast feeding) o in 30 min (slow feeding) da pazienti obesi prima e dopo LSG. Entrambi i pasti sono stati somministrati a partire dal tempo 0 min. Valori espressi come media±SEM. \*p<0,05 vs il corrispondente punto della fase post-LSG; \*p<0,05 vs il corrispondente valore basale al tempo 0 min.

### **STUDIO III**

*Effetto dell'assunzione di cibo palatabile sulla secrezione di PYY, GLP-1, ghrelina ed eCBs in adulti obesi precedentemente saziati.*

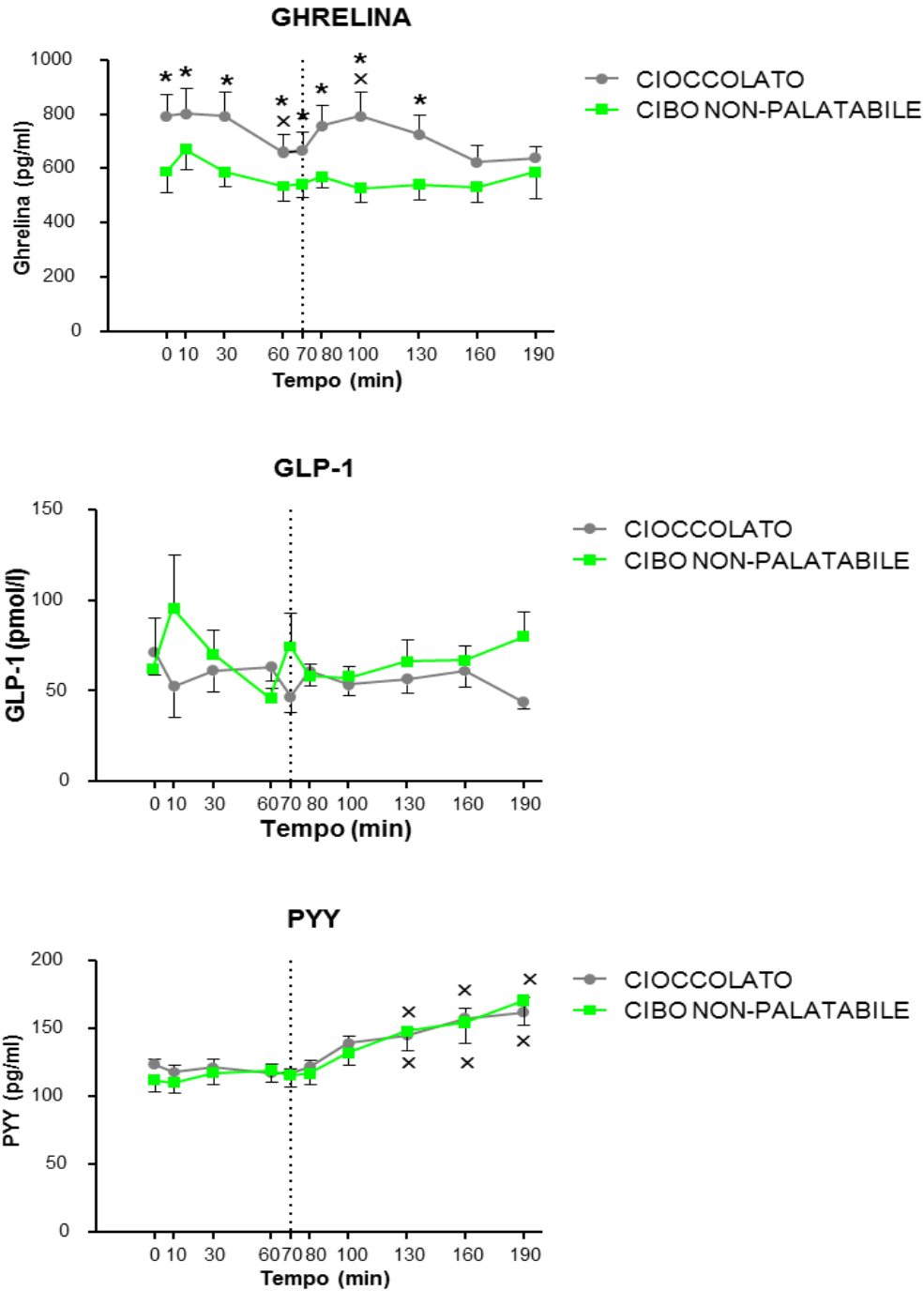
Le caratteristiche demografiche, cliniche dei soggetti dello studio sono riportate nella Tabella 3.

	Pazienti obesi
Numero (n.)	10
Età	33,4 ± 9,0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	42,9 ± 3,5
FFM (kg)	78,9 ± 12,6
FFM (%)	58,9 ± 5,1
FM (kg)	54,8 ± 7,8
FM (%)	41,2 ± 5,1

**Tab. 3:** Caratteristiche demografiche, cliniche dei soggetti obesi arruolati nello studio.

Durante la sessione edonica si osservava una riduzione significativa dei livelli circolanti di ghrelina a 60 min (vs 0 min dopo la colazione,  $p < 0,01$ ) nei soggetti obesi, mentre non vi era alcuna differenza significativa in ciascun tempo della sessione colazione + cibo non-palatabile. Inoltre, i soggetti obesi durante la sessione edonica, mostravano concentrazioni plasmatiche di ghrelina significativamente più elevate, rispetto alla sessione non-palatabile, in ciascun punto temporale ( $p < 0,01$ ), fatta eccezione per i tempi 160 e 190 min (Fig. 24).

Entrambe le sessioni sperimentali (colazione + cioccolato vs colazione + cibo non-palatabile) evocavano un identico aumento significativo dei livelli circolanti di PYY a 130 min, 160 min e 190 min (vs 70 min dopo l'assunzione di cioccolato o di cibo non-palatabile,  $p < 0,01$ ) (Fig. 24). Indipendentemente dalla sessione sperimentale i livelli circolanti di GLP-1 non differivano in maniera significativa (Fig. 24).



**Fig. 24:** Concentrazioni plasmatiche di ghrelina, GLP-1 e PYY nei soggetti obesi dopo colazione (a sinistra della linea tratteggiata, T0-T70) e dopo l'assunzione di cioccolato o di cibo non-palatabile (a destra della linea tratteggiata T70-T190) durante la sessione edonica e non-palatabile rispettivamente. La colazione veniva consumata da T0 a T10, mentre il cioccolato o il pasto non-palatabile veniva consumato dal T70 a T80 a seguito dell'esposizione sensoriale al cibo e la visione di immagini di alimenti a base di cioccolato (durante la sessione edonica) o di paesaggi e panorami (durante la sessione non-palatabile) dal T60 a T70. I valori sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore della sessione non-palatabile.  $\times p < 0,05$  vs il corrispondente valore T0 o T70.

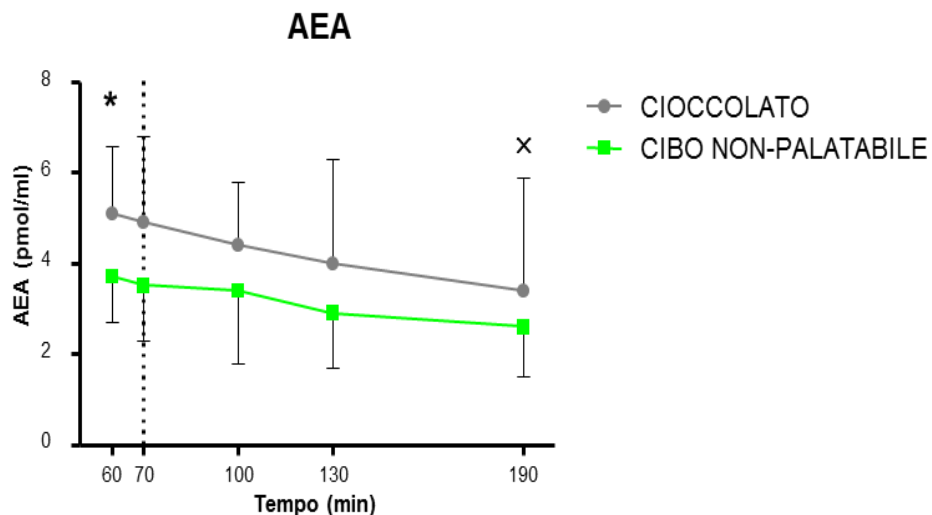
I livelli plasmatici di AEA diminuivano significativamente a 190 min (vs 60 min,  $p < 0,05$ ) nei soggetti obesi durante la sessione edonica, mentre non veniva

riscontrata alcuna differenza significativa durante la sessione non-palatabile (analisi intra-gruppo). Inoltre, nei soggetti obesi il consumo di cioccolato provocava concentrazioni significativamente più levate di AEA a 60 min ( $p < 0,05$ ) (Fig. 25).

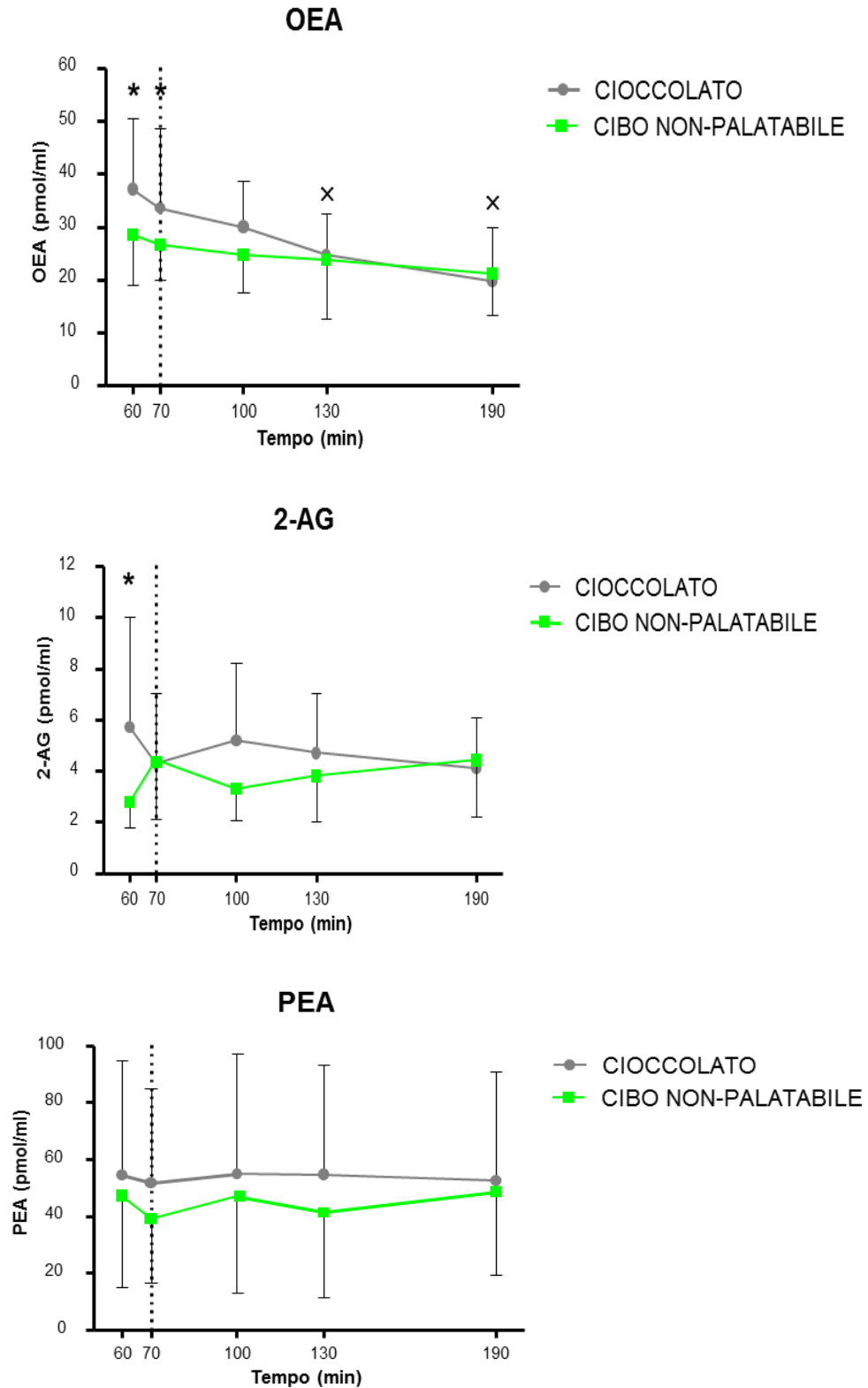
I livelli circolanti di 2-AG non variavano significativamente nei diversi tempi sperimentali, ma solo tra le due diverse sessioni. Infatti, i soggetti obesi durante la sessione edonica avevano concentrazioni plasmatiche più elevate di 2-AG a 60 min ( $p < 0,05$ ) rispetto alla sessione non-palatabile (Fig. 25).

I livelli circolanti PEA non variavano in maniera significativa nei diversi tempi sperimentali e tra le due sessioni sperimentali (Fig. 25).

Diversamente, si osservava una riduzione significativa dei livelli di OEA a 130 min e 190 min (vs 60 min,  $p < 0,05$ ) nei soggetti obesi dopo aver consumato colazione + cioccolato, mentre non vi era alcuna differenza significativa nei pazienti dopo il consumo di colazione + cibo non-palatabile (analisi intra-gruppo). Inoltre, nei soggetti obesi si riscontravano concentrazioni plasmatiche più elevate di OEA durante la sessione edonica rispetto a quella non-palatabile, precisamente a 60 min e 70 min ( $p < 0,05$ ) (Fig.25).



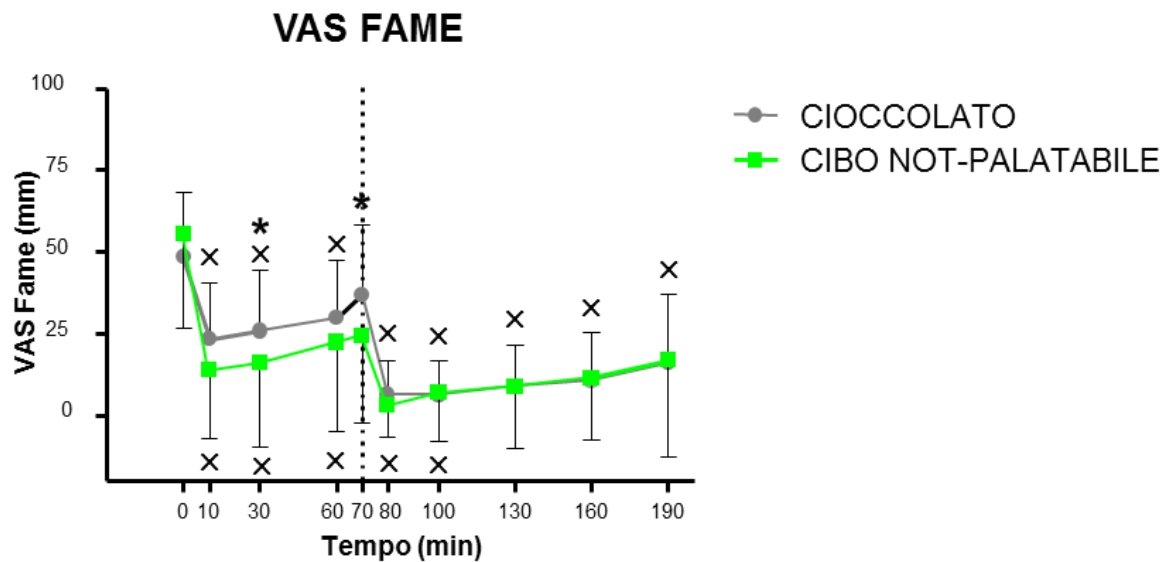


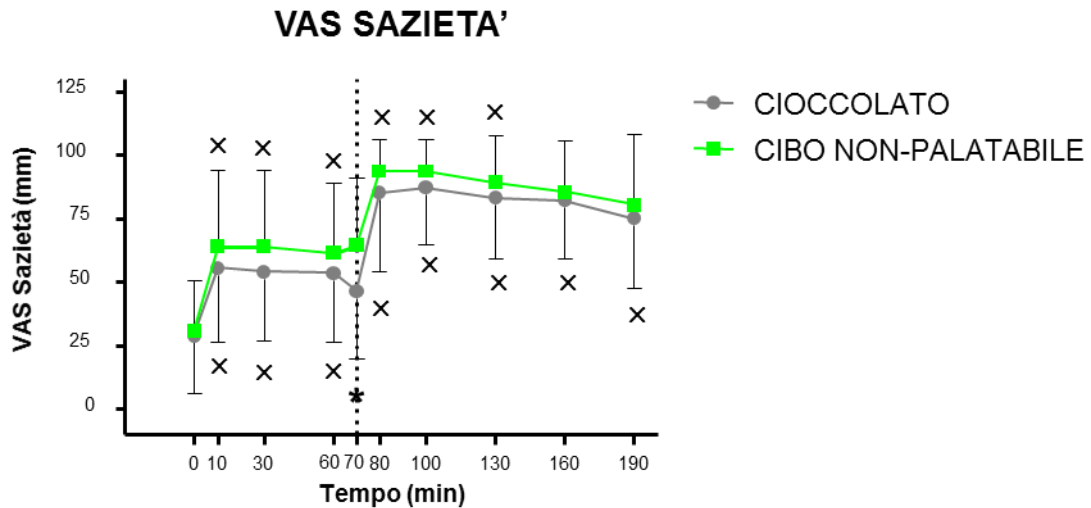


**Fig. 25:** Concentrazioni plasmatiche di AEA, 2-AG; PEA e OEA in soggetti obesi precedentemente saziati (T60-T70) dopo l'assunzione di cioccolato o di un pasto non-palatabile- Il cioccolato o il pasto non palatabile veniva consumato da T70 a T80 dopo un'esposizione sensoriale al cibo e la visione di immagini di alimenti a base di cioccolata (sessione edonica) o paesaggi e panorami (durante la sessione non-palatabile) dal T60 a T70. I valori sono espressi come media  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore della sessione non-palatabile.  $\times p < 0,05$  vs il corrispondente valore T60.

Il punteggio delle VASs relative al senso di fame diminuiva in maniera significativa a 10 min, 30 min e 60 min (vs 0 min dalla colazione;  $p < 0,01$ ) durante entrambe le sessioni sperimentali e a 80 min e 100 min (vs 70 min dopo l'assunzione di cioccolato o cibo non-palatabile); mentre solo durante la sessione edonica si osservava una riduzione significativa anche a 130 min, 160 min e 190 min (vs 70 min dopo l'assunzione di cioccolato). Inoltre, i soggetti obesi indicavano punteggi maggiori per le VASs relative alla fame a 30 e 70 min ( $p < 0,01$ ) (Fig.26)

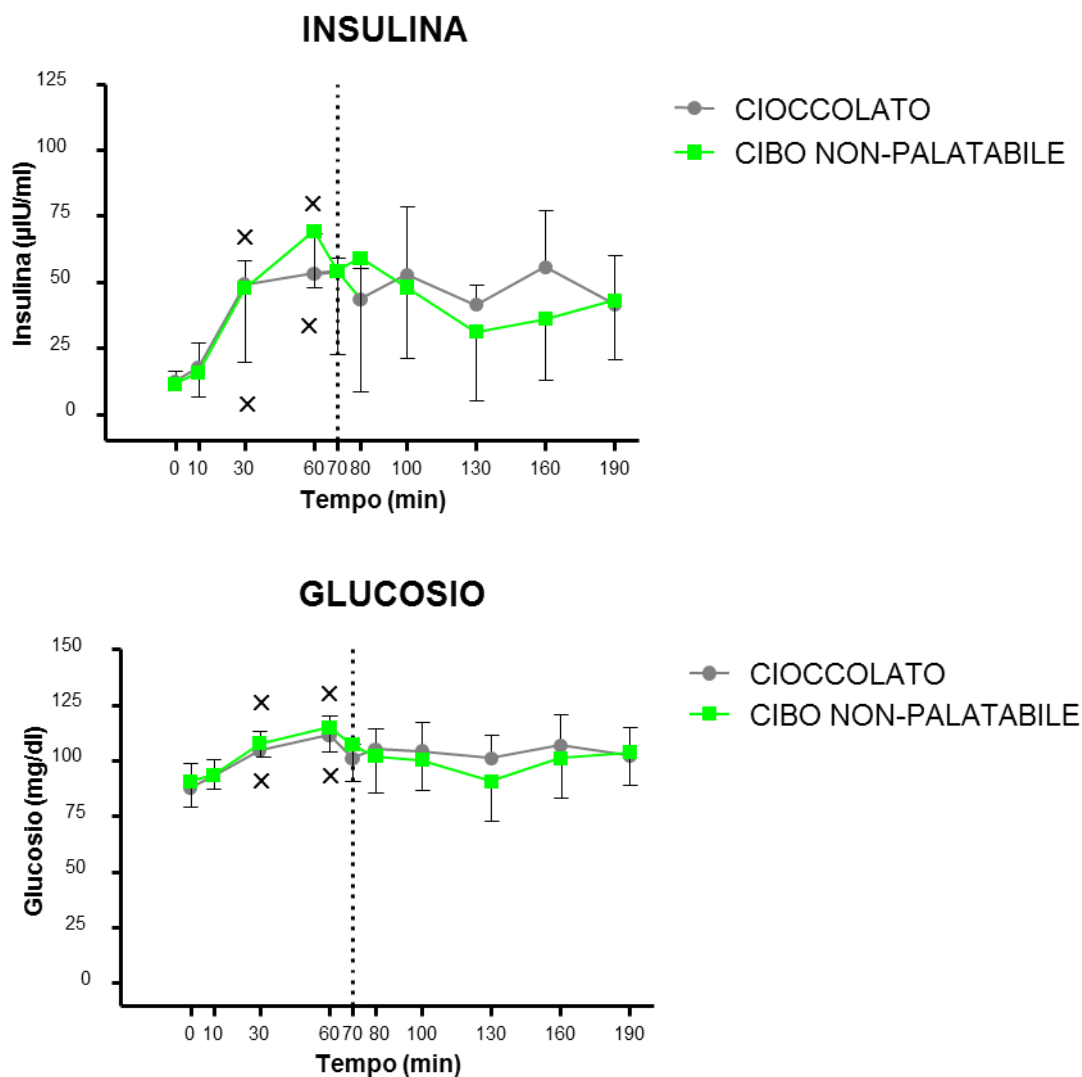
Il punteggio delle VASs relative alla sazietà variava significativamente nei diversi punti sperimentali. In particolare, si osservava un aumento significativo del senso di sazietà a 10 min, 30 min e 60 min (vs 0 min dopo la colazione,  $p < 0,01$ ) e a 100 min e 130 min (vs 70 min dopo l'assunzione di cioccolato o di cibo non-palatabile) ad entrambe le sessioni; mentre anche a 160 min e 190 min (vs 70 min dall'assunzione di cioccolato) nella sessione edonica (analisi intra-gruppo). Inoltre, durante la sessione edonica i soggetti obesi riportavano punteggi minori nelle VASs a 70 min ( $p < 0,01$ ) per il senso di sazietà rispetto alla sessione non-palatabile (Fig.26).





**Fig. 26:** Andamento dei punteggi delle VASs della fame e della sazietà nei soggetti obesi dopo colazione (a sinistra della linea tratteggiata, T0-T70) e dopo l'assunzione di cioccolato o di cibo non-palatabile (a destra della linea tratteggiata T70-T190) durante la sessione edonica e non-palatabile rispettivamente. La colazione veniva consumata da T0 a T10, mentre il cioccolato o il pasto non-palatabile veniva consumato dal T70 a T80 a seguito dell'esposizione sensoriale al cibo e la visione di immagini di alimenti a base di cioccolato (durante la sessione edonica) o di paesaggi e panorami (durante la sessione non-palatabile) dal T60 a T70. I valori sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore della sessione non-palatabile. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore T0 o T70.

Le concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina cambiavano in maniera significativa ai vari tempi di prelievo, ma non tra le due sessioni sperimentali (colazione + cioccolato o colazione + cibo non-palatabile). Infatti, entrambe le sessioni sperimentali evocavano un identico aumento significativo delle concentrazioni di glucosio a 30 min e a 60 min (vs 0 min dopo colazione,  $p < 0,01$ ) (Fig.27).



**Fig. 27:** Concentrazioni sieriche di glucosio e insulina nei soggetti obesi dopo colazione (a sinistra della linea tratteggiata, T0-T70) e dopo l'assunzione di cioccolato o di cibo non-palatabile (a destra della linea tratteggiata T70-T190) durante la sessione edonica e non-palatabile rispettivamente. La colazione veniva consumata da T0 a T10, mentre il cioccolato o il pasto non-palatabile veniva consumato dal T70 a T80 a seguito dell'esposizione sensoriale al cibo e la visione di immagini di alimenti a base di cioccolato (durante la sessione edonica) o di paesaggi e panorami (durante la sessione non-palatabile) dal T60 a T70. I valori sono espressi come media±SEM. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore della sessione non-palatabile. \* $p < 0,05$  vs il corrispondente valore T0 o T70.

Il valore di AUC dei livelli circolanti di ghrelina era significativamente più elevato nei soggetti obesi durante la sessione edonica rispetto a quella non-palatabile. Nessuna differenza significativa veniva osservata per AUCs dei livelli circolanti di GLP-1 e PYY. Il valore di AUC dei livelli circolanti di AEA era significativamente più elevato nei soggetti obesi quando consumavano colazione + cioccolato rispetto a colazione + cibo non-palatabile. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata per le AUCs dei livelli circolanti di 2-AG, PEA e OEA. Infine, nessuna differenza

significativa è stata riscontrata per le AUCs dei punteggi delle VASs relative al senso di fame e di sazietà e per le concentrazioni di glucosio e insulina (Tab.4)

	Palatabile	Non-palatabile	p
Ghrelin (pg/ml x min)	110488,2±9905,7	87651,1±8611,8	p<0,05
GLP-1 (pmol/l x min)	8619,9±727,5	11929,3±1294,6	-
PYY (pg/ml x min)	23449,6±1208,8	23142,5±2188,2	-
AEA (pmol/l x min)	535,0±225,7	374,0±73,1	p<0,05
2-AG (pmol x min)	599,1±211,8	468,2±184,4	-
PEA (pmol x min)	6995,1±4806,0	5409,6±3001,2	-
OEA (pmol x min)	3458,7±1055,5	2905,8±862,4	-
VAS Fame (mm x min)	2002,5±2118,0	1875,0±3064,3	-
VAS Sazietà (mm x min)	12612,5±3643,7	13616,0±2966,3	-
Glucosio (mg/dl x min)	16600.0±1408.7	15672.5±2061.4	-
Insulina (µIU/ml x min)	8007.6±3732.5	7676.1±4072.7	-

**Tab. 4:** Valori di AUC dei livelli circolanti di peptidi, eCBs e parametri metabolici e dei punteggi delle VASs relative al senso di fame e di sazietà.  
AUC<sub>0-190</sub> per ghrelin, PYY, GLP-1, punteggi delle VASs relative al senso di fame e di sazietà, glucosio e insulina.  
AUC<sub>60-190</sub> per AEA, 2-AG, PEA, e OEA.

# DISCUSSIONE

---

La sindrome di Prader-Willi è caratterizzata da una mancanza di sazietà probabilmente legata a difetti nello sviluppo cerebrale (in particolare a livello ipotalamico), responsabili dell'iperfagia, con conseguente grave obesità dalla prima infanzia (Goldstone AP, 2006). Secondo quanto riferito, i pazienti PWS hanno livelli plasmatici di ghrelina inappropriatamente elevati per la loro obesità (DelParigi A et al., 2002; Goldstone AP et al., 2004; Tauber M et al., 2004; Bizzarri C et al., 2004; Bizzarri C et al., 2010). È ancora da dimostrare se lo stato iperghrelinemico contribuisca all'iperfagia in PWS; in ogni caso sono state riportate altre anomalie degli ormoni gastroenterici, in particolare per i peptidi anoressigenici GLP-1 e PYY (Bizzarri C et al., 2010; Butler MG et al., 2004; Goldstone AP et al., 2005; Giménez-Palop O et al., 2004; Paik KH et al., 2007; Purcell L et al 2011).

Sebbene l'obesità semplice sia stata associata all'unanimità con l'attenuazione delle risposte postprandiali di GLP-1 e PYY, risultati contrastanti sono stati trovati nei pochi studi condotti finora in pazienti PWS (De Silva A et al., 2012; Verdich C et al., 2001). Alcuni autori hanno osservato che gli adulti e i bambini PWS hanno minori livelli di PYY a digiuno e postprandiali rispetto ai controlli, mentre altri non hanno riportato differenze, o livelli di PYY più elevati (Butler MG et al., 2004; Giménez-Palop O et al., 2004; Goldstone AP et al., 2005; Paik KH et al., 2007; Goldstone AP et al., 2012; Bizzarri C et al., 2010; Purcell L et al., 2011). Al contrario, non è stata evidenziata nessuna differenza nelle concentrazioni plasmatiche a digiuno di GLP-1 (totale) e postprandiali di GLP-1 (attivo) tra pazienti PWS, pazienti affetti da obesità semplice e soggetti normopeso (Goldstone AP et al., 2004; Haqq AM et al., 2011; Purcell L et al., 2011).

I peptidi anoressigenici GLP-1 e PYY vengono rilasciati in risposta all'ingestione di nutrienti dalle cellule endocrine di tipo L, principalmente localizzate a livello dell'ileo distale (Adrian TE et al., 1985; Ghatei MA et al., 1983; Orskov C et al., 1994; Gutniak M et al., 1992; Willms B et al., 1996; Batterham RL et al., 2002). La somministrazione esogena di GLP-1 e PYY riduce l'apporto energetico in soggetti normopeso e sovrappeso (Batterham RL et al., 2003). L'ipotalamo e il tronco encefalico rappresentano le aree più rilevanti nel mediare gli effetti

periferici sazianti ed ipofagici di GLP-1 e PYY (Abbott CR et al., 2005; Blevins JE et al., 2008). Negli ultimi anni, questi peptidi anoressigenici gastrointestinali sembrerebbero essere coinvolti nel meccanismo sottostante la perdita di peso indotta da alcuni interventi di chirurgia bariatrica, come LSG (Papailiou J et al., 2010).

Recentemente, abbiamo dimostrato che l'assunzione di cibo ad una velocità fisiologicamente lenta (*slow feeding*), rispetto all'assunzione rapida (*fast feeding*), porta ad una risposta più pronunciata da parte dei peptidi anoressigenici gastrointestinali solo negli adolescenti obesi, mentre gli adulti obesi mostrano differenze trascurabili (Rigamonti AE et al., 2013). In particolar modo, mentre il *fast feeding* non stimolava il rilascio di GLP-1 in entrambi i gruppi, lo *slow feeding* provocava un aumento dei livelli circolanti di GLP-1 solo negli adolescenti obesi. Inoltre, in confronto ai valori basali, le concentrazioni plasmatiche di PYY aumentavano a seguito dell'assunzione di cibo indipendentemente dalla velocità di assunzione. Infine, lo *slow feeding* stimolava più efficacemente il rilascio di PYY negli adolescenti rispetto agli adulti obesi.

Uno studio con fMRI (Malik S et al., 2008) ha dimostrato che la somministrazione endovenosa di ghrelina in soggetti normopeso aumentava la risposta neuronale ad immagini di cibo nelle aree coinvolte nell'elaborazione del *reward* e del comportamento appetitivo, come l'amigdala, lo striato ventrale, l'insula anteriore e OFC. Inoltre, i dati sperimentali hanno dimostrato che nei topi, la somministrazione di ghrelina nel terzo ventricolo aumentava significativamente l'attività locomotoria così come i livelli extracellulari di dopamina nel nucleo accumbens (Jerlhag E et al., 2007), un sistema neurochimico coinvolto nel sistema *reward* e motivazionale, e l'assunzione di cibo (Berridge KC et al., 1998). È stato dimostrato che l'attivazione di queste aree neuroanatomiche possa essere influenzata da livelli anormali di ghrelina associati ad un rischio genetico per l'obesità (Karra E et al., 2013).

In seguito alla somministrazione esogena di PYY<sub>3-36</sub> e GLP-1<sub>7-36amide</sub>, singolarmente e in combinazione, si osservavano riduzioni nell'attività neuronale in aree come striato, insula e OFC in risposta ad immagini di cibo palatabile (De Silva A et al., 2011), suggerendo effetti inibitori da parte di questi ormoni sulle stesse regioni stimulate da ghrelina. Di conseguenza, soggetti

obesi con ridotti livelli circolanti di PYY e insensibilità a GLP-1 (Batterham RL et al., 2003; Näslund E et al., 1999), potrebbero avere teoricamente una maggiore attività in aree come striato, insula e OFC durante l'esposizione al cibo.

Per quanto riguarda i dati su animali da laboratorio suggeriscono che l'esposizione al cibo con elevate proprietà rinforzanti possa stimolare il tono endocannabinoide ad indurre il rilascio di dopamina nell'area limbica (Di Marzo V et al., 2009). Questo potrebbe, a sua volta, portare ad una maggiore motivazione a consumare cibo palatabile e ad intensificare gli effetti di gratificazione dopo il consumo di questi cibi.

Monteleone et al. (2012), studiando la regolazione dei livelli circolanti di ghrelina e eCBs a seguito di una sessione edonica in soggetti normopeso precedentemente saziati, hanno dimostrato che il consumo di cibo per puro piacere era associato a un aumento dei livelli circolanti di ghrelina e 2-AG. Contrariamente, i livelli plasmatici di AEA e dei due lipidi metabolicamente correlati a AEA e agonisti di PPAR- $\alpha$ , PEA e OEA, diminuivano progressivamente dopo l'assunzione di cibo palatabile e non-palatabile.

## **STUDIO I**

Nel presente studio, dopo assunzione di cibo (*fast* e *slow feeding*), si osservavano livelli di PYY più elevati nei soggetti normopeso, rispetto ai pazienti con obesità semplice, senza differenze significative tra soggetti normopeso e pazienti PWS. I pazienti PWS mostravano livelli di PYY più elevati rispetto ai pazienti obesi, solo quando sottoposti a *fast feeding*.

I livelli postprandiali di GLP-1 nei pazienti PWS e nei soggetti normopeso, erano superiori a quelli dei pazienti obesi, ad entrambe le velocità di assunzione del pasto. Inoltre, il *fast feeding* evocava una risposta nettamente superiore di GLP-1 nei pazienti PWS rispetto ai soggetti normopeso. Rispetto al *fast feeding*, lo *slow feeding* evocava una più marcata risposta dei peptidi anoressigenici nei soggetti normopeso, ma non nei pazienti obesi, confermando le conclusioni di alcuni recenti studi (Kokkinos A et al., 2010; Rigamonti AE et al., 2013).

Inaspettatamente, nei pazienti PWS, solo l'assunzione rapida del pasto era in grado di evocare una robusta risposta dei peptidi anoressigenici. In particolare, mentre entrambe le velocità di assunzione del pasto stimolavano il rilascio di GLP-1 nei soggetti normopeso, ma non nei pazienti obesi, solo il *fast feeding*



era in grado di aumentare i livelli circolanti di GLP-1 nei pazienti PWS. Inoltre, rispetto alle condizioni basali, le concentrazioni di PYY nel plasma erano aumentate dal pasto indipendentemente dalla velocità di assunzione in tutti i gruppi.

In conclusione, lo *slow feeding* è risultato più efficace nello stimolare il rilascio di GLP-1 e PYY nei soggetti normopeso, ma non nei pazienti obesi; mentre il *fast feeding* è risultato inaspettatamente lo stimolo più efficace nei pazienti PWS.

Il presente studio ha dimostrato l'esistenza di un'esagerata risposta anoressigenica in PWS, quando un pasto ricco di grassi viene assunto velocemente. La velocità di assunzione sembra essere fondamentale nello stimolare una risposta dei peptidi anoressigeni, in particolare questa differente risposta alla velocità di assunzione del pasto potrebbe spiegare le discrepanze riscontrate nei diversi studi che hanno valutato la secrezione postprandiale dei peptidi anoressigenici in PWS (Bizzarri C et al., 2010; Butler MG et al., 2004; Purtell L et al., 2011).

Le ragioni dell'iperreattività anoressigenica in PWS sono attualmente difficili da spiegare, infatti non è chiaro se questa disregolazione nell'assunzione di cibo sia un evento primario o secondario che precede o segue, rispettivamente, l'iperfagia, uno dei sintomi più importanti in PWS (McAllister CJ et al., 2011). Tuttavia, questo comportamento alimentare anomalo è estremamente deleterio per i pazienti PWS. Infatti, l'efficace, anche se transitorio, controllo dell'iperfagia, che diminuisce solo con un consumo vorace del pasto (*fast feeding*), potrebbe innescare episodi ripetuti e, quindi, essere la causa del successivo sviluppo di una grave obesità.

I risultati intra- e inter-gruppo del presente studio confermano la diversa origine fisiopatologica dell'obesità semplice e del PWS. Infatti, mentre la perdita di un aumento della produzione di peptidi anoressigenici dopo *slow feeding* comporta che i pazienti obesi (adulti) non raggiungano la saziazione postprandiale, i pazienti PWS necessitano di mangiare più velocemente per avere una risposta postprandiale anoressigenica soddisfacente (Rigamonti AE et al., 2013).

A nostro parere, al momento del reclutamento di pazienti PWS negli studi clinici, è fondamentale considerare l'età dei soggetti. Infatti, le risposte postprandiali dei peptidi oressigenici e anoressigenici possono essere diverse nei bambini vs

adulti PWS, e questo potrebbe spiegare, almeno in parte, le differenze nei risultati dei diversi studi (Goldstone AP et al., 2012). Al riguardo, è stata dimostrata l'esistenza di una soppressione postprandiale marcata di ghrelina e un'elevazione postprandiale più spiccata di PYY nei bambini, ma non negli adulti PWS (McAllister CJ et al., 2011; Bizzarri C et al., 2004).

Con il peggioramento età-correlato dell'iperfagia, questo meccanismo di compensazione diventa inefficace e altri comportamenti alimentari anormali emergano in età adulta, compresa l'iperreattività anoressigenica dopo il *fast feeding*. Ulteriori studi sono necessari per valutare gli effetti di *fast vs slow feeding* sulla risposta dei peptidi anoressigenici in bambini vs adulti PWS.

Nel presente studio, lo *slow feeding* evocava una sazietà maggiore e una fame minore nei soggetti normopeso, ma non nei pazienti obesi. Inaspettatamente, nei pazienti PWS, si osservava una sazietà maggiore, nonché una fame inferiore quando il pasto veniva assunto velocemente. Questi risultati sono pienamente congruenti con le potenti risposte anoressigeniche di GLP-1 e PYY nello *slow feeding* dei soggetti normopeso e nel *fast feeding* dei pazienti PWS. Mentre i soggetti normopeso e i pazienti obesi sono stati valutati in studi precedenti, per quanto a nostra conoscenza, nessuno ha valutato gli effetti di diverse velocità di assunzione del cibo sulla fame e sulla sazietà in PWS. I risultati del presente studio confermano l'aumento della fame e la riduzione della sazietà postprandiali nei pazienti PWS rispetto a soggetti normopeso (con significatività statistica dopo *fast feeding*). La mancanza di differenze significative nelle sensazioni di fame e sazietà tra PWS e pazienti obesi potrebbe essere spiegata dal numero relativamente basso di soggetti arruolati. Ad ogni modo, l'originalità del presente studio risiede nella dimostrazione di una maggiore saziazione, derivante da una ridotta fame e un'augmentata sazietà, quando i pazienti PWS mangiano velocemente.

Dato che il PYY viene rilasciato entro 15 min dall'assunzione di cibo, questo deve avvenire prima che i nutrienti ingeriti raggiungono l'intestino tenue e il colon distale (dove sono presenti le maggiori concentrazioni di PYY). Pertanto, è probabile che l'iniziale rilascio postprandiale di PYY sia sotto controllo neurale. Ulteriore rilascio di PYY si osserva quando le sostanze nutrienti arrivano alla porzione distale dell'intestino e il rilascio è particolarmente stimolato da una dieta ricca di grassi (De Silva A et al., 2012); anche il GLP-1 mostra una risposta

bifasica dopo un pasto: il primo picco si verifica prima che i nutrienti raggiungano l'intestino distale, ed è aumentata da un pasto ad alto contenuto di carboidrati (Delzenne N et al., 2010).

Nel presente studio, la fame era diminuita e il senso di sazietà era aumentato dopo *slow feeding* nei soggetti normopeso, rispettivamente a 150 min e 60 min; nei pazienti PWS il *fast feeding* evocava le stesse risposte in tempi più precoci (per fame e sazietà a 30 min). Questi risultati sembrano suggerire il contributo del controllo neurale per gli effetti anoressizzanti del *fast feeding* in PWS. L'ipotesi che il *fast feeding* induca maggiore saziazione a causa di un'alterazione dei circuiti neurali a livello della corteccia prefrontale (controllo corticale dell'assunzione di cibo) o della motilità gastrointestinale (controllo autonomo dell'assunzione di cibo) in PWS non è da escludere (Holsen LM et al., 2012; Arenz T et al., 2010).

Il mantenimento della sensibilità insulinica osservato nei pazienti PWS arruolati nel presente studio è in accordo con i risultati di altri studi e può essere, almeno in parte, spiegato dagli elevati livelli circolanti di ghrelina (sia acilata che deacilata), che potrebbe aumentare la sensibilità insulinica nell'adulto con PWS (DelParigi A et al., 2002; Goldstone AP et al., 2004; Tauber M et al., 2004; Bizzarri C et al., 2010; Haqq AM et al., 2008).

Devono essere menzionati alcuni limiti del presente studio. In primo luogo, è stato arruolato solo un numero limitato di pazienti PWS e di soggetti normopeso e ciò potrebbe aver influenzato la significatività statistica di alcuni risultati sperimentali, come quella dei livelli basali di PYY nei pazienti obesi che avrebbero dovuto essere inferiori a quelli nei soggetti normopeso. In secondo luogo, i gruppi di obesi e PWS non erano perfettamente bilanciati per genere, e la possibilità di risultati discrepanti per genere non può essere esclusa. In terzo luogo, la composizione del pasto somministrato durante il test non corrispondeva alla dieta standard raccomandata; quindi, i risultati del presente studio non possono essere generalizzati (cioè, un pasto diverso potrebbe dare risultati diversi). In linea con la nostra esperienza recente, abbiamo scelto il gelato perché è un pasto qualitativamente omogeneo e altamente appetibile, che può essere facilmente somministrato in un contesto sperimentale e rapidamente consumato (solo 5 min) (Rigamonti AE et al., 2013). Infine, i pazienti PWS e i soggetti obesi stavano prendendo parte di un programma

multidisciplinare di riduzione del peso, ed è stato fatto ogni sforzo per ridurre il potenziale effetto della riduzione del peso corporeo sui risultati sperimentali (es.: ordine casuale delle due prove, realizzazione dell'intero protocollo entro la prima settimana di ricovero dei pazienti, un intervallo limitato tra le due prove).

In conclusione, il presente studio dimostra che mangiare lo stesso pasto in 5 min, invece che in 30 min, porta a più elevate concentrazioni di peptidi intestinali anoressigenici e favorisce la saziazione (cioè riduzione della fame e aumento della sazietà) in pazienti adulti PWS, a differenza di quanto osservato in soggetti normopeso o pazienti con obesità semplice di pari età.

Nei pazienti PWS, la tendenza a mangiare velocemente potrebbe essere un meccanismo di compensazione per controbattere l'iperfagia ma, a lungo termine, questo comportamento alimentare diventa controproducente, favorendo lo sviluppo di obesità grave.

Interventi farmacologici e programmi educativi e di sostegno psicologico devono essere indirizzati a correggere questa specifica disregolazione nell'assunzione di cibo in PWS. L'uso di agonisti GLP-1 a lunga durata d'azione (come exenatide e liraglutide), che aumentano la risposta postprandiale anoressigenica, potrebbe costituire una valida soluzione terapeutica, che richiede, tuttavia, ulteriori studi per confermarne l'efficacia (Sze L et al., 2011).

## **STUDIO II**

Lo scopo del presente studio era di esaminare i variazioni dei livelli circolanti dei peptidi anoressigenici gastrointestinali dopo l'assunzione di un pasto a diverse velocità (*fast e slow feeding*) in soggetti obesi sottoposti a LSG, un intervento di chirurgia bariatrica ampiamente utilizzato nella pratica clinica, con il fine di identificare il meccanismo sottostante la perdita di peso indotta da LSG.

Recentemente, abbiamo dimostrato che l'assunzione di un pasto a velocità moderata (*slow feeding*), rispetto al *fast feeding*, provoca una risposta anoressigenica più pronunciata solo in adolescenti obesi, mentre per gli adulti obesi non si riscontra nessuna differenza tra le due velocità (Rigamonti AE et al., 2013).

Nel presente studio, in fase post-operatoria non veniva riscontrata alcuna differenza tra i livelli di PYY a digiuno (totale). Ad entrambe le velocità di assunzione del pasto, si osservava un aumento significativo dei livelli post-

prandiali di PYY (vs 0 min) solo 3 mesi dopo LSG. Nessuna differenza significativa veniva evidenziata nel rilascio post-prandiale di PYY confrontando *slow* e *fast feeding*; al contrario, i livelli post-prandiali di PYY post-LSG erano significativamente più elevati rispetto a quelli riscontrati nella fase pre-LSG.

Nonostante la drastica riduzione del volume gastrico derivante da LSG, questi risultati non sono inattesi, dato che la secrezione di PYY non risulta essere alterata dalla distensione gastrica e dalla presenza di afferenze vagali intatte (Oesch S et al., 2006). Inoltre, siccome il rilascio di PYY nell'uomo si verifica inizialmente in risposta all'ingestione dei nutrienti, in particolar modo dei grassi, che raggiungono l'ileo (Adrian TE et al., 1985), nel caso di LSG si potrebbe ipotizzare che lo svuotamento gastrico (probabilmente) accelerato da LSG, promuovendo un più rapido passaggio dei nutrienti all'intestino tenue, possa essere il meccanismo responsabile dell'esagerata risposta post-prandiale di PYY post-LSG (Ballantyne et al., 2006; Dimitriadis E et al., 2013). Nonostante una maggiore secrezione di PYY dopo LSG rispetto alla fase pre-LSG, questa ipotesi non è plausibile, poiché, come dimostrato dal presente studio, non sono stati misurati livelli post-prandiali di PYY significativamente più elevati durante il *fast feeding* rispetto allo *slow feeding*. Di conseguenza, in contrasto con le conclusioni di un altro lavoro (Dimitriadis E et al., 2013), la maggiore secrezione post-prandiale di PYY non sembrerebbe contribuire alla ridotta assunzione di cibo e (forse) alla capacità di un individuo di mantenere la perdita di peso dopo LSG. La nostra ipotesi è che l'aumentato rilascio di PYY rappresenti la conseguenza della perdita di peso indotta da LSG (e non la causa), dato che esiste una nota correlazione negativa tra BMI e livelli circolanti di PYY (Rigamonti AE et al., 2013).

Nel presente studio, *fast* e *slow feeding* evocavano un aumento e una riduzione simile rispettivamente del senso di sazietà e di fame, nei pazienti obesi pre- vs post-LSG; inoltre venivano riscontrati valori significativamente maggiori per le VASs della sazietà entro i primi 15 min dopo *fast feeding* rispetto *slow feeding*, mentre non si riscontravano differenze significative nelle VASs della fame ad entrambe le velocità di assunzione del pasto.

Questi risultati sono difficilmente coerenti con le risposte anoressigeniche precedentemente descritte di PYY e GLP-1 conseguenti all'assunzione rapida e lenta di un pasto pre- e post-LSG in soggetti obesi. Difatti, nonostante la VAS

rappresenti lo strumento migliore per valutare la propensione a mangiare o il senso di sazietà, è, ciononostante, una scala psicometrica, diretta a misurare percezioni eminentemente soggettive; di conseguenza, potrebbe non essere abbastanza sensibile nel discriminare le sottili differenze nei soggetti obesi a cui veniva somministrato un pasto a velocità differenti prima e dopo intervento di chirurgia bariatrica (Raben A et al., 1995). Tuttavia, indipendentemente dalla velocità di assunzione del pasto, l'ingestione di cibo era in grado di ridurre o aumentare, rispettivamente, il senso di fame e sazietà, anche nei pazienti obesi che avevano perso peso a seguito di LSG, quando i due parametri venivano confrontati con quelli della fase pre-operatoria. Di conseguenza, la marcata variazione del senso di fame e sazietà in fase pre- e post-operatoria dopo *fast* e *slow feeding* potrebbe essere interpretata come la dimostrazione del fatto che in caso di LSG, PYY e GLP-1 svolgono un ruolo trascurabile nella stimolazione di una valida risposta anoressigenica (a livello centrale) responsabile della perdita di peso indotta da LSG. Queste considerazioni indicherebbero l'esistenza di altri ormoni gastrointestinali (non necessariamente anoressigenici) o più in generale di altri meccanismi fisiologici, coinvolti nella perdita di peso da LSG. E' importante notare che i livelli più alti del senso di fame e di sazietà dopo *fast* e *slow feeding*, che erano identici nella fase pre- e post-LSG, sembrerebbero contraddire l'ipotesi che LSG sia solo una procedura di tipo "restrittivo" (Melissas J et al., 2007). Infatti, in questo caso ci saremmo dovuti aspettare una risposta esagerata per la sazietà durante l'assunzione rapida di cibo nel "piccolo volume" di porzione residua dello stomaco dopo LSG. Tuttavia, questa interpretazione dovrebbe essere considerata con cautela perché il pasto somministrato nel presente studio era semi-solido (gelato) e, di conseguenza, facile da ingerire. Non possiamo escludere che l'impiego di un protocollo sperimentale differente potrebbe provocare valori minori e maggiori, rispettivamente, per il senso di fame e di sazietà, dopo la perdita di peso indotta da LSG.

Nel presente studio, la perdita di peso indotta da LSG era associata con un marcato miglioramento della resistenza insulinica, come dimostrato dai livelli post-prandiali di glucosio e insulina significativamente ridotti dopo *fast* e *slow feeding*. Questi risultati sono ben noti dalla letteratura (Cho JM et al., 2015) e per questo non verranno ulteriormente discussi.

La ghrelina, un potente peptide oreoressigenico, viene principalmente prodotto a livello gastrico, nonostante vi siano altre sedi di produzione come duodeno, digiuno e polmone (Ariyasu H et al., 2001; Møller N et al., 2003). Questo peptide è un ormone a rapida azione caratterizzato da un aumento pre-prandiale e da una riduzione post-prandiale, che svolge un ruolo cruciale nella stimolazione dell'assunzione del cibo. La resezione di una vasta porzione dello stomaco potrebbe spiegare la marcata riduzione dei livelli a digiuno e post-prandiali di ghrelina e la mancanza di fame che si osserva in fase post-operatoria in un'alta percentuale di pazienti sottoposti a LSG, nonostante l'estrema restrizione calorica e il bilancio energetico negativo derivanti dall'operazione (Papailiou J et al., 2010).

In questo studio non sono stati misurati i livelli circolanti di ghrelina che, diversamente da PYY e GLP-1, non variano durante l'assunzione di cibo a diverse velocità (Kokkinos A et al., 2010). Tuttavia, noi riteniamo che la secrezione ridotta di ghrelina possa essere uno dei più importanti meccanismi che contribuiscono all'efficacia complessiva e al bilancio energetico negativo che si osserva dopo LSG (Karamanakos SN et al., 2008). Di conseguenza, LSG potrebbe essere considerata come una procedura che limita l'apporto di cibo attraverso la riduzione del tessuto secernente ghrelina, senza l'attivazione di una robusta risposta anoressigenica dei peptidi gastrointestinali. L'importanza dello stato ipoghrelinamico indotto da LSG non esclude altri meccanismi neuroumorali o fisiologici sottostanti la perdita di peso mediata da LSG, attualmente sconosciute che richiedono ulteriori studi in futuro.

Devono essere menzionati alcuni limiti del presente studio. Per esempio, la valutazione dei peptidi anoressigenici gastrointestinali, dell'appetito e delle risposte glucometaboliche a diverse velocità di assunzione di cibo è stata effettuata solo 3 mesi dopo LSG. Di conseguenza, sono necessari ulteriori studi per confermare questi risultati dopo un intervallo di tempo più lungo (es: 6 e 12 mesi). Noi abbiamo misurato solamente due ormoni anoressigenici gastrointestinali, PYY e GLP-1, escludendone altri come PP, amilina e leptina di cui non si conosce la variazione dei livelli circolanti a seguito di assunzione di cibo a velocità diverse.

Infine, la composizione del pasto non corrispondeva alla dieta standard raccomandata; quindi, i risultati del presente studio non possono essere

generalizzati (cioè un pasto diverso potrebbe dare risultati diversi). In linea con la nostra recente esperienza, come già precedentemente riferito, abbiamo scelto come pasto il gelato perché qualitativamente omogeneo e altamente appetibile, inoltre può essere facilmente somministrato in un contesto sperimentale e consumato rapidamente (solo 5 min).

In conclusione, la perdita di peso indotta da LSG sembrerebbe essere associata con un aumento dei livelli post-prandiali di PYY, ma non di GLP-1, e con un miglioramento del controllo glucometabolico. Questi effetti sono indipendenti dalla velocità di assunzione del pasto e dalla percezione del senso di fame e di sazietà, suggerendo che i peptidi anoressigenici gastrointestinali contribuiscano in maniera trascurabile alla perdita di peso indotta da LSG e che quindi l'aumento dei livelli di PYY post-LSG possano rappresentare solo l'effetto di una riduzione dell'adiposità corporea.

### **STUDIO III**

Nel presente studio, sono stati riscontrati livelli circolanti di ghrelina persistentemente più elevati nei soggetti obesi durante l'intera sessione edonica (colazione + cibo palatabile), in cui, un'ora dopo la colazione, veniva servita una tavoletta di cioccolato per un'esperienza sensoriale completa, terminata la quale questa poteva essere liberamente consumata; al contrario venivano riscontrato uno stabile profilo di ridotti livelli circolanti di ghrelina durante la sessione non-palatabile, in cui il cioccolato veniva sostituito con un pasto non-palatabile isoenergetico e isobromatologico (pane e burro). Inoltre, durante la prima parte della sessione edonica, si osservava un'inibizione significativa della secrezione di ghrelina a seguito della colazione, che non era in grado di ridurre i livelli circolanti dello stesso peptide oressigenico quando i soggetti obesi erano sottoposti alla sessione non-palatabile.

Infine, l'esperienza con il cibo palatabile (la seconda parte della sessione con l'esposizione diretta al cioccolato, la visione di immagini riguardanti cibo a base di cioccolato e il consumo della tavoletta di cioccolato) aumentavano in maniera significativa la secrezione di ghrelina, mentre non si riscontrava nessuna variazione durante l'ultima parte della sessione non-palatabile, in cui il pasto veniva servito in congiunzione alla visione di immagini raffiguranti paesaggi e panorami naturali, per poi essere interamente consumato.



Nel nostro protocollo sperimentale, la saziazione veniva raggiunta a seguito di una colazione di 300 kcal. Nonostante possa sembrare un quantitativo calorico insufficiente per sopprimere completamente il senso di fame nei soggetti obesi dopo un digiuno di 12 h, risulta essere ciononostante, in linea con le abitudini nutrizionali italiane. L'inattesa iperghrelinemia, sopprimibile con la colazione, veniva riscontrata durante la sessione edonica nei soggetti obesi già al T0, prima dell'inizio del test sperimentale. Questa osservazione era in contrasto con i ridotti livelli circolanti e la mancata soppressione post prandiale di ghrelina che caratterizzano l'obesità (semplice), come osservato nei soggetti obesi durante la sessione non-palatabile del presente studio, oltre che in altri lavori (Heiman ML, 2001; English PJ et al., 2002).

Nei soggetti obesi arruolati nello studio l'aumento dei livelli plasmatici di ghrelina, prima dell'inizio della sessione sperimentale e anche a seguito della somministrazione del pasto palatabile (T100), sembrerebbe riflettere la stimolazione della secrezione di ghrelina che si verifica durante la fase cefalica (o alternativamente, la fase anticipatoria) dell'ingestione di cibo altamente palatabile, quando qualsiasi individuo (magro o obeso) pensa, guarda e/o odora il cibo senza mangiarlo (Simonian HP et al., 2005). L'effetto anticipatorio del cibo altamente palatabile rappresenta naturalmente, un aspetto cruciale per il nostro protocollo sperimentale: specificatamente, i partecipanti dello studio erano a conoscenza della sessione sperimentale in cui avrebbero mangiato cibo altamente palatabile, data la necessità di bilanciare l'apporto energetico e la composizione bromatologica del cibo non-palatabile con quella del pasto palatabile.

Tuttavia, all'inizio della sessione edonica e dopo l'esposizione del cibo palatabile, si verificavano aumenti dei livelli di ghrelina (al T0 e T100) relativamente più pronunciati nei soggetti obesi arruolati nel presente studio rispetto a quelli misurati nei soggetti normopeso da Monteleone et al. (Monteleone P. et al., 2012) dove era stato utilizzato un protocollo simile.

Sulla base di queste osservazioni si potrebbe ritenere che i soggetti obesi così come quelli normopeso, consapevoli che avrebbero mangiato cibo palatabile il giorno prima del test sperimentale, fossero maggiormente sensibili a qualsiasi stimolo correlato al cibo rispetto ai soggetti normopeso, con una conseguente secrezione di ghrelina più pronunciata. Questo profilo secretorio della ghrelina

non compariva a durante la sessione non-palatabile, in cui i livelli circolanti di ghrelina rimanevano ridotti durante l'intero protocollo. Come detto in precedenza, quest'ultima modalità secretoria è quella maggiormente conosciuta e comunemente descritta nella maggior parte dei lavori riguardanti gli effetti dell'assunzione di cibo sui livelli circolanti di questo peptide (Tscöhp M et al., 2001; English PJ et al 2002), senza differenziazione tra somministrazione di cibo palatabile e non-palatabile, che invece è fondamentale nell'induzione dell'iperghrelinemia.

Come atteso, nel presente studio, i livelli circolanti di PYY e GLP-1 erano ridotti e si riscontrava solo un lento progressivo aumento nella secrezione di PYY durante la seconda parte delle due sessioni sperimentali, senza alcuna differenza tra il consumo del cibo palatabile e non-palatabile. Quindi, se l'attivazione del sistema dopaminergico mesolimbico del *reward* indotta dalla ghrelina aumenta il valore motivazionale del cibo e favorisce il comportamento di ricerca del cibo (Jerlhag E et al., 2007), sulla base dei risultati ottenuti nei soggetti obesi, si potrebbe supporre che l'aumentata secrezione di ghrelina, che in maniera analoga si riscontra anche nei soggetti normopeso (Monteleone P et al., 2012) precedente e conseguente il consumo di cibo palatabile, attiva marcatamente le vie centrali del sistema del *reward*, che diversamente dai soggetti normopeso (De Silva A et al., 2011) non vengono inibite (o vengono inibite solo debolmente) da PYY e GLP-1. Quindi, nei soggetti obesi, che solitamente hanno ridotti livelli circolanti di ghrelina (Tscöhp M et al., 2001; English PJ et al., 2002), quando esposti a cibo palatabile, viene promossa l'assunzione di cibo non solo per l'aumento anticipatorio della secrezione di ghrelina, ma anche per un'insufficiente risposta anoressigenica da parte di PYY e GLP-1. Nonostante non sia necessario l'apporto calorico, i soggetti obesi mangiano solamente per le proprietà di ricompensa del cibo altamente palatabile, senza o con un insufficiente "freno anoressigenico".

Questo quadro interpretativo viene confermato anche da altri risultati del presente studio come:

- 1) L'efficacia della colazione di ridurre e aumentare, rispettivamente, il senso di fame e di sazietà durante entrambe le sessioni sperimentali (colazione + cibo palatabile e colazione + cibo non-palatabile), indicando l'induzione di

un simile stato di sazietà, indipendentemente dalla palatabilità del pasto successivo;

- 2) La capacità del cibo palatabile di ridurre e aumentare in minor misura, rispettivamente, il senso di fame e di sazietà (a 70 min) durante la sessione edonica (colazione + cioccolato).

Il presente studio suggerisce l'importanza degli stimoli correlati al cibo palatabile, principalmente di tipo sensoriale, nel promuovere l'assunzione di cibo nei soggetti obesi. Questo meccanismo sembrerebbe essere mediato dalla ghrelina nei soggetti sia normopeso sia obesi, anche se in realtà risulta essere amplificato nell'obesità, con potenziali effetti dannosi a lungo termine in un contesto che offre un'illimitata quantità di cibo palatabile.

La somministrazione di antagonisti della ghrelina, considerati da alcuni autori un intervento terapeutico inappropriato a causa dei ridotti livelli di ghrelina presenti nei soggetti obesi (Horvath TL et al., 2003; Alvarez-Castro P et al., 2013), alla luce di questi risultati preliminari potrebbe costituire una valida soluzione per bloccare gli effetti rinforzanti dell'iperghrelinemia che precede l'esposizione di cibo palatabile e l'ingestione di quantità eccessive di cibo ipercalorico in condizioni di bilancio energetico positivo. Lo stesso risultato potrebbe essere ottenuto con la psicoterapia, finalizzata alla desensibilizzazione dei soggetti cibo-dipendenti dagli stimoli correlati al cibo palatabile. Ulteriori studi sono necessari per valutare il potenziale terapeutico di questi interventi nell'obesità.

I risultati del presente studio suggeriscono anche un coinvolgimento degli eCBs AEA, 2-AG e OEA, nella modulazione della fame edonica. Specificatamente, nei soggetti obesi dello studio, i livelli circolanti di AEA, 2-AG e OEA erano significativamente più elevati a T60, prima dell'esposizione al cioccolato, mentre i livelli di OEA erano gli unici a mantenersi elevati anche a T70, dopo l'esposizione della tavoletta di cioccolato e la visione di immagini di cibo a base di cioccolato. Inoltre, il valore AUC dei livelli circolanti di AEA era significativamente più elevato nei soggetti obesi a cui veniva somministrato cioccolato e non cibo non-palatabile. Infine, si riscontrava una riduzione significativa dei livelli circolanti di AEA e OEA solo al termine della sessione colazione + cioccolato (a 190 min), senza alcuna differenza per gli altri eCBs, 2-AG e PEA, nella stessa sessione e per tutti gli eCBs durante la sessione

colazione + cibo-non palatabile. Questi dati suggeriscono l'attivazione di una produzione endogena di AEA, 2-AG e OEA prima dell'esposizione al cioccolato, un effetto simile all'aumento anticipatorio dei livelli di ghrelina durante la sessione edonica. La combinazione dell'aumento di ghrelina e eCBs (almeno per quanto riguarda i gli agonisti CB1 dotati di proprietà rinforzanti, AEA e 2-AG) potrebbe promuovere il "volere mangiare" e il "piacere di mangiare" in una condizione in cui non vi è alcuna deprivazione energetica (Jager G et al., 2014). In accordo, nel presente studio, i punteggi delle VASs per il senso di fame erano positivamente correlati con i livelli circolanti di AEA (e PEA). Un limite per questa argomentazione è costituito dalla mancanza della misura dei livelli di eCBs prima di T60.

L'aumento dei livelli di AEA e 2-AG riscontrati nei soggetti obesi esposti a cibo palatabile potrebbe essere il risultato dello "spill-over" dalle aree cerebrali del sistema del *reward*. Alternativamente, i livelli circolanti di questi eCBs potrebbero riflettere lo "spill-over" dai tessuti periferici, come l'intestino tenue e/o il tessuto adiposo, che come il cervello rispondono alla deprivazione di cibo e all'assunzione di cibo con conseguente variazione dei livelli locali di eCBs (Izzo AA et al., 2009; Di Patrizio NV et al., 2011; Di Marzo V et al., 2011). Allo stesso modo non dovrebbe essere esclusa la possibilità di un controllo cerebrale per la produzione "periferica" di eCBs; in questo modo, gli effetti anticipatori del cibo altamente palatabile, mediati a livello centrale, potrebbero influenzare lo "spill-over" di eCBs a livello periferico dall'intestino tenue o dal tessuto adiposo. Ulteriori studi sono necessari per determinare se l'aumento dei livelli circolanti di eCBs riflettono l'attivazione di meccanismi biochimici a livello dei tessuti periferici o direttamente a livello delle aree cerebrali coinvolte nel sistema del *reward*. Questo potrebbe essere importante per la caratterizzazione di nuovi target farmacologici per l'obesità. Nel lavoro di Monteleone et al. (2012), condotto in soggetti normopeso sottoposti ad un protocollo simile al nostro, veniva riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di ghrelina e quelli di 2-AG, entrambi misurati come AUC, suggerendo un'interazione tra ghrelina e il sistema endocannabinoide. In accordo con alcuni studi condotti sull'animale (Kola B et al., 2008; Cani PD et al., 2004; Rigamonti AE et al., 2006), è stato proposto che il ruolo della ghrelina periferica sugli effetti rinforzanti del cibo altamente palatabile viene mediato dall'attivazione della produzione endogena

di eCBs, in particolare 2-AG. Come evidenziato dal presente studio, nei soggetti obesi non vi era alcuna correlazione tra ghrelina e 2-AG o con l'altro agonista CB1 dotato di proprietà rinforzanti, AEA, ma solo tra ghrelina e OEA.

Finora sono state riportate poche evidenze per il ruolo di PPAR- $\alpha$  e dei due ligandi di PPAR- $\alpha$ , OEA e PEA, sugli effetti rinforzanti, a parte uno studio in cui è stata evidenziata un'azione anti-rinforzante da parte di questi composti (Mascia P et al., 2011). Di conseguenza, è difficile interpretare questa correlazione così come l'osservazione di livelli circolanti più elevati di OEA (ma non PEA) in soggetti obesi esposti al cioccolato rispetto a quando venivano confrontati con la sessione colazione + cibo non-palatabile. Questo risultato è in contrasto con lo studio di Monteleone et al. (2012), in cui nei soggetti normopeso, i livelli di OEA e PEA erano simili in entrambi i gruppi sia durante la sessione edonica sia durante quella non-palatabile, suggerendo un ruolo causale dello stato di obesità per il peculiare profilo secretorio di OEA nei soggetti obesi arruolati nel presente studio. Di conseguenza, sono necessari ulteriori studi per comprendere il ruolo fisiologico e le implicazioni patofisiologiche degli agonisti PPAR- $\alpha$ , inclusi PEA e OEA endogeni, nell'assunzione di cibo e in generale nel sistema del *reward*.

Monteleone et al. (Monteleone et al., 2012), avevano evidenziato una riduzione significativa di AEA, 2-AG, PEA e OEA dopo il consumo del pasto, indipendentemente se il cibo fosse palatabile o non-palatabile. Sebbene sia stato dimostrato che l'insulina riduca i livelli circolanti di AEA e 2-AG in modo inversamente correlato ai markers metabolici di insulino-resistenza e dislipidemia, senza alcuna informazione specifica per quanto riguarda PEA e OEA (Di Marzo V et al., 2009), nel presente studio, l'osservazione di livelli circolanti inalterati di 2-AG e PEA dopo somministrazione di cibo palatabile e di tutti gli eCBs dopo cibo non-palatabile, è probabilmente dovuta all'incapacità dell'insulina di inibire la biosintesi, o all'aumento della degradazione di questi composti nei soggetti obesi insulino-resistenti (Di Marzo V et al., 2009). Questa spiegazione può essere messa in discussione dalla riduzione dei livelli di AEA dopo l'ingestione di cibo palatabile, sebbene fosse veramente lenta e probabilmente dovuta alle variazioni circadiane dei livelli di questo composto, descritte in precedenza a livello cerebrale nel ratto (Valenti M et al., 2004). D'altra parte, la riduzione dei livelli circolanti di OEA dopo l'ingestione di

cioccolato (ma non di cibo non-palatabile) sembrerebbe dimostrare una peculiare via secretoria di questo endocannabinoide, non appartenente al circuito del *reward*, nei soggetti obesi esposti a cibo palatabile.

Prima di concludere, devono essere menzionati alcuni limiti del presente studio. A causa del disegno sperimentale impiegato nel presente studio (dove i soggetti erano a conoscenza del tipo di sessione sperimentale a cui stavano per partecipare), non possiamo escludere degli effetti di ordine sistematico. D'altra parte questa scelta è stata adoperata per esigenze sperimentali: per la necessità di evocare l'effetto anticipatorio del cibo palatabile e di somministrare cibo non-palatabile con lo stesso contenuto calorico e bromatologico del cioccolato. Questo modello di condizionamento non può essere ottenuto mediante un disegno sperimentale alternativo, in cui l'ordine di somministrazione dei due cibi (palatabile e non-palatabile) potesse essere randomizzato.

Inoltre, i risultati del presente studio riscontrati nei soggetti obesi, sono stati confrontati con quelli dei soggetti normopeso considerati nello studio di Monteleone et al. (Monteleone et al., 2012). Nonostante, questi autori abbiano utilizzato un protocollo simile al nostro, ciononostante, hanno utilizzato un cibo edonico differente. Infatti, ai soggetti reclutati nel presente studio veniva chiesto di mangiare cioccolato come se fosse uno dei loro cibi preferiti, mentre nello studio di Monteleone et al., (2012), ai soggetti normopeso veniva chiesto di scegliere il loro cibo preferito, che non necessariamente doveva essere cioccolato. La possibilità che l'utilizzo esclusivo di cioccolato in questo studio sia la fonte delle differenze osservate non deve essere trascurata per almeno due ragioni:

- 1) E' stato riportato che il cioccolato contenga composti che agiscono a livello centrale e questo potrebbe spiegare le proprietà rinforzanti del cibo stesso insieme alle sue peculiari caratteristiche sensoriali, oltre che modificare (reprimere o stimolare) la biosintesi di eCBs sia a livello centrale che periferico.
- 2) E' stato descritto che il cioccolato, in particolar modo il cioccolato bianco, contenga tracce di eCBs, così come OEA (di Tomaso et al., 1996; Di Marzo V et al., 1998). Quest'ultima evidenza in realtà non sembrerebbe influenzare i livelli plasmatici di AEA, 2-AG e OEA, che risultavano essere più elevati prima (T70) e/o immediatamente dopo (T100) il consumo di cioccolato o di cibo non-

palatabile. Inoltre, sembra che venga assorbita una quantità veramente esigua di eCBs con la dieta e aciletanolamidi dopo metabolizzazione di questi nel tratto gastrointestinale prima di essere assorbite. Tuttavia, i componenti psicoattivi del cacao, come caffeina, teobromina e feniletanolamina potrebbero svolgere azioni modulatorie sulla biosintesi dei mediatori lipidici influenzando i livelli misurati negli ultimi punti sperimentali.

Infine, bisogna ricordare che abbiamo reclutato un numero limitato di soggetti maschi obesi. E' risaputo che le donne preferiscano maggiormente il cioccolato rispetto ai uomini (91% delle donne vs 59% di uomini) (Osman JL et al., 2006). Di conseguenza, è plausibile che donne obese possano sviluppare un'esagerata risposta ghrelinemica al cibo palatabile, specificatamente al cioccolato. Ulteriori studi sono necessari per valutare (potenziali) differenze di genere e confermare i risultati preliminari del presente studio.

In conclusione, similmente a quanto accade nei soggetti normopeso (Monteleone et al., 2012), quando la motivazione a mangiare viene promossa dalla disponibilità di cibo altamente palatabile e non solo per deprivazione da cibo, nei soggetti obesi si osserva un'attivazione periferica di specifici segnali endogeni dotati di proprietà rinforzanti inclusi ghrelina, AEA e 2-AG. Tuttavia, rispetto ai soggetti normopeso, questa risposta sembrerebbe essere amplificata specialmente per quanto riguarda la ghrelina, senza alcuna risposta anoressigenica post-prandiale per GLP-1 e PYY. Dopo il primo ritiro di rimonabant, un agonista inverso per CB1 utilizzato originariamente per ridurre il peso corporeo nell'obesità, dal mercato farmaceutico per problemi di sicurezza, il presente studio preliminare potrebbe suggerire l'efficacia dell'impiego di antagonisti neutri per il recettore della ghrelina e CB1 per il trattamento dell'assunzione "compulsiva" di cibo palatabile nell'obesità.

I 3 studi descritti nel presente lavoro di tesi sottolineano come, la scoperta dei circuiti regolatori dell'appetito a livello centrale e la comprensione dell'asse cerebro-intestinale possano essere di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi potenziali trattamenti e target farmacologici per i disordini alimentari, come l'obesità semplice e genetica.

Il trattamento clinico di PWS include generalmente una restrizione e una stretta supervisione dell'apporto di cibo da parte dei familiari. Se non viene gestita la supervisione del cibo in maniera adeguata, PWS potrebbe sfociare in obesità patologica, causa principale del rischio cardiorespiratorio. Nessuno degli attuali trattamenti/strategie di intervento sull'appetito per PWS include trattamenti farmacologici, sebbene recenti studi abbiano mostrato risultati promettenti. Risultati estremamente positivi sono stati ottenuti negli studi di trattamento con exenatide (un farmaco per il trattamento del diabete di tipo II con ridotti effetti collaterali sulla popolazione generale) in pazienti PWS (Sze L et al., 2011). L'iniezione sottocutanea di exenatide (10µg), riduceva i livelli circolanti di PYY, senza influenzare quelli di ghrelina o GLP-1 e la glicemia, aumentando parallelamente il senso di sazietà senza effetti collaterali. Sfortunatamente, tra i partecipanti non venivano misurate riduzioni dei punteggi delle VASs per il senso di fame. In modo analogo una ragazza di 19 anni PWS e diabete di tipo 2 evidenziava un miglioramento del controllo del peso e della glicemia durante trattamento con exenatide (Seetho IW et al., 2011) per oltre 12 mesi.

La chirurgia bariatrica, ad oggi, rappresenta il più efficace trattamento per l'obesità semplice in termini di: perdita di peso, riduzione di comorbidità, e miglioramento della sopravvivenza (Folgueira C et al., 2014; Scholtz S et al., 2014).

A seguito dell'intervento bariatrico, i pazienti mostrano regolarmente una consistente riduzione del senso di fame, probabilmente dovuta all'alterazione del profilo ormonale a livello gastrico (le Roux et al., 2007). Infatti, in fase post-chirurgica si riscontrano: ridotti livelli di ghrelina (se parte dello stomaco è asportata nell'intervento), un aumento degli ormoni contro-regolatori per il glucosio (come insulina, GIP e GLP-1) e degli ormoni del "freno ileale", come PYY (le Roux et al., 2007). La riduzione delle dimensioni dello stomaco del paziente limita fisicamente la quantità di cibo che un soggetto può assumere prima di sentirsi pieno, e conseguentemente ne riduce l'apporto per un periodo di tempo sufficiente a garantire un considerevole calo ponderale. Oltre alla perdita di peso, poco dopo l'intervento, si registra un significativo miglioramento dell'omeostasi glucidica (Mingrone G et al., 2012), che si ritiene essere causata



da un'alterata secrezione degli ormoni gastrointestinali. Di conseguenza, mimare questo profilo secretorio farmacologicamente potrebbe costituire un'efficiente strumento per modulare la perdita di peso, consentendo di sviluppare nuovi farmaci anti-obesità (Kellum JM et al., 1990; Le Roux et al., 2006; Morinigo R et al., 2006). Contrariamente, se si volesse solamente intervenire sulle abitudini alimentari, cambiando la composizione dei macronutrienti e riducendo l'apporto calorico, sarebbe difficile mantenere la perdita di peso nel tempo (Tsai AG et al., 2005). Infatti, le variazioni compensatorie degli ormoni gastrointestinali, indotte dalla dieta, come l'aumento di rimbalzo dei livelli circolanti di ghrelina, potrebbero contribuire al mancato mantenimento della perdita di peso a lungo termine (Cummings DE et al., 2001).

I ridotti livelli di PYY<sub>3-36</sub> endogeno in fase di digiuno e il minor aumento dei livelli postprandiali, che si osservano nell'obesità (Batterham RL et al., 2003), non sembrano essere legati ad una possibile resistenza al PYY<sub>3-36</sub> (come si verifica invece per la leptina), dato che l'infusione endovena di PYY<sub>3-36</sub> è in grado di ridurre allo stesso modo l'apporto energetico nei soggetti obesi e in quelli magri (Batterham RL et al., 2003). Uno studio svolto secondo lo stesso protocollo di Batterham, ha poi dimostrato che la marcata riduzione dell'apporto energetico, a seguito dell'infusione endovena di PYY<sub>3-36</sub>, era sostenuta da un forte senso di nausea (Sloth B et al., 2007).

Gli studi successivi hanno cercato di sviluppare un modo più pratico per somministrare il peptide nell'uomo. Generalmente, gli ormoni peptidici, come l'insulina, vengono somministrati per via sottocutanea. Tuttavia, i primi studi condotti sul PYY<sub>1-36</sub> e PYY<sub>3-36</sub>, in cui venivano somministrati per via sottocutanea, non hanno riportato alcun effetto sull'assunzione di cibo, nonostante i partecipanti allo studio mostravano un senso di sazietà maggiore con l'aumentare della dose di PYY<sub>3-36</sub> (Sloth B et al., 2007). Rimane però ancora da chiarire, perché la somministrazione sottocutanea di PYY<sub>3-36</sub> non abbia effetto, anche se il motivo potrebbe essere legato alla degradazione e all'inattivazione biologica dell'ormone peptidico.

Nello stato postprandiale, anche l'azione del PYY sulle afferenze vagali gastrointestinali fornisce un importante contributo nel mediare il senso di sazietà (Koda S et al., 2005). Infatti, si ritiene che la somministrazione orale del

PYY<sub>3-36</sub> possa mimare meglio lo stato fisiologico postprandiale e offrire così, un importante vantaggio rispetto alle altre vie di somministrazione sistemica. Comunque, l'ambiente acido e la presenza degli enzimi pancreatici degradativi a livello gastrico rendono difficile la somministrazione orale. Per superare queste limitazioni sono attualmente in studio sistemi nanotecnologici che contano di facilitare la somministrazione orale, come per esempio la tecnologia basata sull'associazione dei peptidi con un veicolo, il sodio-N-caprilato, capace di facilitare l'assorbimento del peptide. Gli studi condotti in fase clinica I e II hanno dimostrato un effettivo assorbimento gastrico e una riduzione consistente del 12% nell'assunzione di cibo rispetto al placebo, costituito dal singolo veicolo, senza provocare nausea (Steinert RE et al., 2010).

PYY è co-localizzato con altri ormoni anoressizzanti, come GLP-1 e OXM nelle cellule L e viene co-secreto a seguito della stimolazione di queste cellule da parte dei nutrienti (Anini Y et al., 1999). Quindi, un approccio polifarmaceutico potrebbe mimare meglio lo stato fisiologico postprandiale e di conseguenza essere promettente per il trattamento dell'obesità.

Obineptide (7TM Pharma) è un peptide sintetico, analogo di due ormoni della sazietà, come PYY<sub>3-36</sub> e PP, che si trova attualmente in fase II della sperimentazione clinica. PYY<sub>3-36</sub> orale e la combinazione PYY<sub>3-36</sub>/GLP-1 sono attualmente in fase I della sperimentazione clinica, avendo mostrato effetti positivi sull'apporto calorico e sul calo ponderale in fase preclinica.

Nei modelli animali e durante il trattamento clinico, il peptide biologicamente attivo GLP-1 porta ad una riduzione acuta dell'assunzione di cibo (Rodriquez de Fonseca F et al., 2000; Chelikani PK et al., 2005; De Silva A et al., 2011). L'effetto è però limitato dalla breve emivita che determina una durata d'azione ridotta conseguente alla degradazione operata da DPP-IV. Sfortunatamente, questo limita il potenziale terapeutico di GLP-1<sub>7-37</sub> e GLP-1<sub>6-36</sub>. Comunque, l'impiego clinico di agonisti di GLP-1 rimane una tra le più promettenti e innovative terapie che utilizzano come target gli ormoni gastroenterici, con due programmi in fase clinica III derivanti da terapie diabetiche di tipo peptidico, somministrate per via sottocutanea: liraglutide (Novo Nordisk) ed exenatide (Amylin/Lilly) (Shiromani PJ et al., 2012). Liraglutide ha il 97% di omologia di sequenza con il peptide GLP-1, mentre exenatide è un peptide incretino-

mimetico. Una formulazione orale di liraglutide ha iniziato gli studi di fase clinica I nel 2010 e potrebbe portare vantaggi significativi qualora si rivelasse efficace.

La ghrelina è l'unico ormone gastrointestinale con azione oressigenica, e di conseguenza potrebbe essere utile utilizzare un inibitore o antagonista della forma attiva della ghrelina per indurre la perdita di peso corporeo. Il primo candidato ad agire come antagonista selettivo della ghrelina è stato il peptide Spiegelmer® NOX-B11. Questo acido nucleico non-naturale sviluppato da NOXXON Pharma lega specificatamente la forma bioattiva della ghrelina, che sopprime il rilascio del GH ghrelino-indotto portando ad una riduzione del peso corporeo nei modelli animali (Kobelt P et al., 2006). Attualmente, Pfizer ha acquisito la licenza di portare avanti lo sviluppo di NOX-B11 negli animali.

La somministrazione endovena di ghrelina nell'uomo, seguita dall'esposizione ad immagini di cibo porta ad un'elevata risposta delle regioni cerebrali coinvolte nei circuiti del *reward*, secondo quanto dimostrato mediante fMRI (Malik S et al., 2008). Inoltre, in diversi studi condotti su roditori si è dimostrata la capacità di ghrelina di promuovere l'assunzione di cibo non-omeostatica.

La somministrazione sia centrale sia periferica di ghrelina nei ratti aumenta la loro motivazione ad avere saccarosio, effetto che veniva abolito con la somministrazione dell'antagonista peptidico per il recettore della ghrelina (JMV) (Skibicka KP et al., 2012).

Diversi studi preclinici e clinici (Matias I et al., 2007; Bermudez-Silva FJ et al., 2010) suggeriscono l'esistenza di una stretta associazione positiva tra l'obesità e l'iperattività del sistema eCB, che si manifesta con una produzione in eccesso di eCBse/o aumento dell'espressione dei recettori endocannabinoidi a livello centrale e dei tessuti periferici coinvolti nella regolazione dell'omeostasi energetica. Sulla base di queste osservazioni, il ripristino del normale tono eCB, attraverso farmaci che interferiscano con il *signaling* degli eCBs, viene considerato un potenziale approccio terapeutico per arrestare sia lo sviluppo sia il mantenimento dell'obesità e delle co-morbidità correlate all'obesità.

Gli iniziali studi preclinici condotti con rimonabant hanno dimostrato la validità di questa ipotesi (Cota D et al., 2003). Rimonabant è stato, però ritirato dal commercio nell'Ottobre del 2008 per disposizione dell'AIFA, a seguito dell'elevatissimo rischio di effetti collaterali a livello psichico dovuti alla sua

assunzione. Questi eventi hanno profondamente influenzato l'industria farmaceutica. Infatti, lo sviluppo di altri antagonisti CB1, come otenabant (Pfizer), ibipinabant (Solvay/Bristol-Myers Squibb), surinabant (Sanofi-Aventis), e taranabant (Merck) sono stati interrotti e il loro ulteriore sviluppo non è stato più proseguito a causa degli effetti avversi di tipo psichiatrico (Addy C et al., 2008a,b; Kipnes MS et al., 2010).

Nuovi antagonisti puri CB1 o antagonisti che agiscono a livello periferico, incapaci di superare la barriera ematoencefalica, sono stati sviluppati con lo scopo di preservare gli effetti positivi di rimonabant e per evitare gli indesiderati effetti psichiatrici. Molti di questi nuovi composti hanno già fornito risultati promettenti a livello preclinico (Tam J et al., 2010,2012). Tra questi farmaci troviamo AM4113, AM6545, LH-21, JD5037, o URB447.

AM4113 attraversando la barriera ematoencefalica e legando CB1 a livello centrale, rafforza il controllo positivo sull'appetito in ratti Sprague-Dawley che si nutrono con una dieta normale o con una dieta ad alto contenuto di carboidrati o ad alto contenuto di grassi (Sink KS et al., 2008). AM6545 rappresenta un antagonista con elevata affinità per i recettori periferici CB1 e mostra un'elevata resistenza alla permeabilità della barriera ematoencefalica (Tam J et al., 2012). Nei topi con obesità dieta-indotta produceva gli stessi effetti del rimonabant, migliorando la steatosi epatica e il profilo lipidico (Tam J et al., 2012). LH-21 è caratterizzato da una ridotta penetrazione cerebrale e sembra agire su CB1 periferici, secondo quanto riportato dagli studi in vitro (Alonso M et al., 2012). Ratti con obesità indotta dalla dieta mostrano una riduzione dell'assunzione di cibo e dell'espressione genetica di leptina, siacidi grassi sintasi e di steroil-CoA-desaturasi 1 (Alonso M et al., 2012), a seguito del trattamento subcronico con LH-21. Lo stesso farmaco, però non era in grado di inibire l'accumulo di acidi grassi nel fegato e non migliorava i parametri metabolici nei ratti Zucker, suggerendo che la mancanza dell'agonismo inverso o della scarsa penetrazione a livello cerebrale, potrebbe costituire un limite (Pavón FJ et al.,2008). JD5037 è un antagonista/agonista inverso in grado di bloccare CB1 periferici sotto acuta e cronica somministrazione in topi con obesità dieta-indotta, provocando riduzione del peso e dell'assunzione di cibo, migliorando la steatosi epatica e la sensibilità insulinica (Tam J et al., 2012). URB447 è stato identificato come un antagonista CB1/antagonista CB2 con

azioni anoressizzanti e privo di effetti a livello centrale (LoVerme J et al.,2009).Tra tutti questi antagonisti CB1 periferici, solo per LH-21 sono stati valutati gli effetti psichiatrici (Griebel G et al., 2005). Di conseguenza, nei prossimi studi sarà importante valutare i potenziali effetti collaterali di questi nuovi composti ad azione periferica.

# BIBLIOGRAFIA

---

- Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JR, Ghatei MA, Bloom SR The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem- hypothalamic pathway. *Brain Res.* 2005 May 17; 1044(1):127-31.
- Abbott CR, Rossi M, Wren AM, et al. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology.* 2001 Aug;142(8):3457-63.
- Abegg, K., Schiesser, M., Lutz, T.A., Bueter, M., 2013. Acute peripheral GLP-1 receptor agonism or antagonism does not alter energy expenditure in rats after Roux-en-Y gastric bypass. *Physiol. Behav.* 121, 70–78.
- Addy, C., Li, S., Agrawal, N., Stone, J., Majumdar, A., Zhong, L., Li, H., Yuan, J., Maes,A., Rothenberg, P., Cote, J., Rosko, K., Cummings, C., Warrington, S., Boyce,M., Gottesdiener, K., Stoch, A., Wagner, J., 2008a. Safety, tolerability, pharma-cokinetics, and pharmacodynamic properties of taranabant, a novel selectivecannabinoid-1 receptor inverse agonist, for the treatment of obesity: resultsfrom a double-blind, placebo-controlled, single oral dose study in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 48, 418–427.
- Addy, C., Rothenberg, P., Li, S., Majumdar, A., Agrawal, N., Li, H., Zhong, L., Yuan, J.,Maes, A., Dunbar, S., Cote, J., Rosko, K., Van Dyck, K., De Lepeleire, I., de Hoon,J., Van Hecken, A., Depré, M., Knops, A., Gottesdiener, K., Stoch, A., Wagner,J., 2008b. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety oftaranabant, a novel selective cannabinoid-1 receptor inverse agonist, in healthymale volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 48, 734–744.
- Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology.* 1985a Nov;89(5):1070-7.
- Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 2003; 278:30429–34.
- Ahima RS and Flier JS, *Leptin*, Annual Review of Physiology, vol. 62, pp. 413–437, 2000.
- Akefeldt A, Ekman R, Gillberg C, Månsson JE. Cerebrospinal fluid monoamines in Prader- Willi syndrome. *Biol Psychiatry.* 1998 Dec 15; 44(12):1321-8.
- Alonso, M., Serrano, A., Vida, M., Crespillo, A., Hernandez-Folgado, L., Jagerovic, N.,Goya, P., Reyes-Cabello, C., Perez-Valero, V., Decara, J., Macías-González, M., Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F., Pavón, F.J., 2012. Anti-obesity efficacy of LH-21, a cannabinoid CB(1) receptor antagonist with poorbrain penetration, in diet-induced obese rats. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2274–2291.
- Alvarez-Castro P, Pena L, Cordido F. Ghrelin in obesity, physiological and pharmacological considerations. *Mini Rev Med Chem* 2013; 13: 541-52.
- Álvarez-Castro P, Sangiao-Alvarellos S, Brandón-Sandá I, Cordido F. Endocrine function in obesity. *Endocrinol Nutr.* 2011 Oct;58(8):422-32.
- Anderson, B., Switzer, N.J., Almamar, A., Shi, X., Birch, D.W., Karmali, S., 2013. The impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on plasma ghrelin levels: a systematic review. *Obes. Surg.* 23 (9), 1476–1480.
- Anderson, S.L. et al. (2010) Association of pancreatitis with GLP-1 agonist use. *Ann. Pharmacother.*44, 904–909.

- Angulo M, Castro-Magana M, Mazur B, Canas JA, Vitollo PM, Sarrantonio M. Growth hormone secretion and effects of growth hormone therapy on growth velocity and weight gain in children with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1996 May- Jun; 9(3):393-400.
- Anini Y, Fu-Cheng X, Cuber JC, Kervran A, Chariot J, Roz C. Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflugers Arch* 1999, 438:299-306.
- Annuzzi G, Piscitelli F, Di Marino L et al., "Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients," *Lipids in Health and Disease*, vol. 9, pp. 43, 2010.
- Arenz, T., Schwarzer, A. & Pfluger, T. (2010) Delayed gastric emptying in patients with Prader Willi Syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 23, 867–871.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G *et al.* Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001 86 4753–4758.
- Aughton DJ, Cassidy SB. Physical features of Prader-Willi syndrome in neonates. Comment in: *Am J Dis Child.* 1992 Feb; 146(2):151-2. *Am J Dis Child.* 1990 Nov; 144(11):1251-4.
- Avenell, A., T. J. Brown, et al. What interventions should we add to weight reducing diets in adults with obesity? A systematic review of randomized controlled trials of adding drug therapy, exercise, behaviour therapy or combinations of these interventions. *J Hum Nutr Diet* 2004; 17(4): 293-316.
- Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obesity Surgery* 2006 16 651–658.
- Baltasar A, Serra C, Pérez N, Bou R, Bengochea M, Ferri L. Laparoscopic sleeve gastrectomy: a multi-purpose bariatric operation. *Obes Surg.* 2005; 15(8):1124-1128.
- Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatgei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. Comment in: *N Engl J Med.* 2003b Sep 4;349(10):926-8. *N Engl J Med.* 2003b Sep 4;349(10):941-8.
- Batterham RL, ffytche DH, Rosenthal JM, Zelaya FO, Barker GJ, Withers DJ, Williams SC. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature.* 2007 Nov 1;450(7166):106-9. Epub 2007 Oct 14.
- Batterham, R.L. et al. (2003) Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2989–3992.
- Batterham, R.L. et al. (2006) Critical role for the peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab.* 4, 223–233.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatgei, M.A., Cone, R.D., Bloom, S.R., 2002. Gut hormone PYY (3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):9048-52.
- Benso, A.; St-Pierre, D. H.; Prodam, F.; Gramaglia, E.; Granata, R.; van der Lely, A. J.; Ghigo, E.; Broglio, F. Metabolic effects of overnight continuous infusion of unacylated ghrelin in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 2012, 166, 911–916.
- Bermudez-Silva, F.J., Viveros, M.P., McPartland, J.M., Rodriguez de Fonseca, F., 2010. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end of a new beginning? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 375–382.
- Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev* 1998; 28: 309-69.

- Bizzarri, C., Rigamonti, A.E., Giannone, G. et al. (2004) Maintenance of a normal meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in children with Prader-Willi syndrome. *Hormone and Metabolic Research*, 36, 164–169.
- Bizzarri, C., Rigamonti, A.E., Luce, A. et al. (2010) Children with Prader-Willi syndrome exhibit more evident meal-induced responses in plasma ghrelin and peptide YY levels than obese and lean children. *European Journal of Endocrinology*, 162, 499–505.
- Blevins JE, Chelikani PK, Haver AC & Reidelberger RD. PYY(3-36) induces Fos in the arcuate nucleus and in both catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the nucleus tractus solitarius of rats. *Peptides* 2008 29 112–119.
- Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc.* 2000 Aug;59(3):373-84.
- Brodie MS, Dunwiddie TV (1987) Cholecystokinin potentiates dopamine inhibition of mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Brain Res* 425:106–113.
- Buchwald, H., Oien, D.M., 2009. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2008. *Obes. Surg.* 19 (12), 1605–1611.
- Buchwald, H., Williams, S.E., 2004. Bariatric surgery worldwide 2003. *Obes. Surg.* 14 (9), 1157–1164.
- Butler MG, Bittel DC. Plasma obestatin and ghrelin levels in subjects with Prader-Willi syndrome. Comment in: *Am J Med Genet A.* 2007 Mar 1;143(5):413-4. *Am J Med Genet A.* 2007 Mar 1;143(5):415-21.
- Butler MG, Butler RI, Meaney FJ. The use of skinfold measurements to judge obesity during the early phase of Prader-Labhart-Willi syndrome. *Int J Obes.* 1988; 12(5):417-22.
- Butler, M.G., Bittel, D.C. & Talebizadeh, Z. (2004) Plasma peptide YY and ghrelin levels in infants and children with Prader-Willi syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 17, 1177–1184.
- Cani PD, Montoya ML, Neyrinck AM, Delzenne NM, Lambert DM. Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br J Nutr* 2004; 92: 757-61.
- Carrasco F, Basfi-Fer K, Rojas P et al., “Changes in bone mineral density after sleeve Gastrectomy or gastric bypass: relationships with variations in vitaminD, ghrelin, and adiponectin levels,” *Obesity Surgery*, vol. 24, no. 6, pp. 877–884, 2014.
- Carrel AL, Lee PDK, Mogul HR. Growth hormone and Prader-Willi syndrome. In: Butler MG, Lee PDK, Whitman BY, eds. *Management of Prader-Willi Syndrome*. 3rd ed. New York, NY. Springer-Verlag; 2006:201-244.
- Cassidy, S.B., Schwartz, S., Miller, J.L. et al. (2012) Prader-Willi syndrome. *Genetics in Medicine*, 14, 10–26.
- Chambers, A.P., Kirchner, H., Wilson-Perez, H.E., et al., 2013. The effects of vertical sleeve gastrectomy in rodents are ghrelin independent. *Gastroenterology* 144 (1), 50–52, e55.
- Chelikani, P.K. et al. (2005) Intravenous infusion of GLP-1 potently inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, 1695–1706.
- Chen C, Visootsak J, Dills S, Graham JM Jr. Prader-Willi syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)*. 2007 Sep; 46(7):580-91. Epub 2007 May 23.
- Chen J, Scott KA, Zhao Z, Moran TH, Bi S. Characterization of the feeding inhibition and neural activation produced by dorsomedial hypothalamic cholecystokinin administration. *Neuroscience*. 2008 Mar 3;152(1):178-88.



- Cho JM, Kim HJ, Menzo EL, Park S, Szomstein S & Rosenthal RJ. Effect of sleeve gastrectomy on type 2 diabetes as an alternative treatment modality to Roux-en-Y gastric bypass: systemic review and meta-analysis. *Surgery for Obesity and Related Diseases* 2015 S1550-7289 00056–00058.
- Clarke DJ, Boer H. Genetic and behavioural aspects of Prader-Willi syndrome: a review with a translation of the original paper. *Ment Handicap Res.* 1995; 8:38-53.
- Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Oct;88(10):4696-701.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of obesity and Related Metabolic Disorders.* 2001 Dec;25 Suppl 5:S63-7.
- Conlon JM. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides.* 2002 Feb;23(2):269-78.
- Cordido F, Garcia-Buela J, Sangiao-Alvarellos S, Martinez T, Vidal O. The decreased growth hormone response to growth hormone releasing hormone in obesity is associated to cardiometabolic risk factors. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:434562.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A.C., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G.K., Pagotto, U., 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 112, 423–431.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001;411(6836):480-4.
- Crinò A, Schiaffini R, Ciampalini P, Spera S, Beccaria L, Benzi F, Bosio L, Corrias A, Gargantini L, Salvatoni A, Tonini G, Trifirò G, Livieri C; Genetic Obesity Study Group of Italian Society of Pediatric endocrinology and diabetology (SIEDP). Hypogonadism and pubertal development in Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr.* 2003 May; 162(5):327-33.
- Cristino L, Becker T and Di Marzo V, “Endocannabinoids and energy homeostasis: an update,” *Biofactors*, vol. 40, no. 4 , pp. 389–397, 2014.
- Cummings, D.E. et al. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggest a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.
- Dakin CL, Small CJ, Park AJ, Seth A, Ghatei MA, Bloom SR. Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Dec;283(6):E1173-7. Epub 2002 Jul 30.
- Davis C, Strachan S, Berkson M. Sensitivity to reward: implications for overeating and overweight. *Appetite.* 2004;42(2):131–8.
- de Carvalho CP, Marin DM, de Souza AL et al., “GLP-1 and adiponectin: effect of weight loss after dietary restriction and gastric bypass in morbidly obese patients with normal and abnormal glucose metabolism,” *Obesity Surgery*, vol. 19, no. 3, pp. 313–320, 2009.
- De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V. Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett* 2001;506:253–6.
- De Silva A, Salem V, Long CJ, Makwana A, Newbould RD, Rabiner EA, et al. The gut hormones PYY 3-36 and GLP-1 7-36 amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite centers in humans. *Cell Metab* 2011; 14: 700-6.
- De Silva, A. & Bloom, S.R. (2012) Gut hormones and appetite control: a focus on PYY and GLP-1 as therapeutic targets in obesity. *Gut Liver*, 6, 10–20.

- Delhanty, P. J.; Neggers, S. J.; van der Lely, A. J. Mechanisms in endocrinology: ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur. J. Endocrinol.* 2012, 167, 601–608.
- DelParigi, A., Tschöp, M., Heiman, M.L. et al. (2002) High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 5461–5464.
- Delzenne, N., Blundell, J., Brouns, F. et al. (2010) Gastrointestinal targets of appetite regulation in humans. *Obesity Reviews*, 11, 234–250.
- Di Marzo V, Ligresti A, Cristino L, “The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation,” *International Journal of Obesity*, vol. 33, no. Suppl 2, pp. S18–S24, 2009.
- Di Marzo V, Verrijken A, Hakkarainen A, Petrosino S, Mertens I, Lundbom N, et al. Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. 2009 Nov;161(5):715-22. doi: 10.1530/EJE-09-0643. Epub 2009 Sep 10.
- Di Marzo V. Endocannabinoids: an appetite for fat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 12567-8.
- Di Marzo, V. (2011) Endocannabinoids: an appetite for fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12567–12568.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járjai, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., Kunos, G., 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825.
- Di Patrizio NV, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 12904-8.
- Dickson SL, Egecioglu E, Landgren S, Skibicka KP, Engel JA, Jerlhag E. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340: 807.
- Diep, T.A., Madsen, A.N., Holst, B., Kristiansen, M.M., Wellner, N., Hansen, S.H., Hansen, H.S., 2011. Dietary fat decreases intestinal levels of the anorectic lipids through a fat sensor. *FASEB J.* 25, 765–774.
- Dimitriadis E, Daskalakis M, Kampa M, Peppe A, Papadakis JA & Melissas J. Alterations in gut hormones after laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective clinical and laboratory investigational study. *Annals of Surgery* 2013 257 647–654.
- DiPatrizio NV, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D (2011). Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12904–12908.
- Dubé PE, Forse CL, Bahrami J, Brubaker PL. The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide 2 in mice. *Gastroenterology*. 2006 Aug; 131(2):589-605. Erratum in: *Gastroenterology*. 2007 Mar; 132(3):1208.
- Dykens EM, Cassidy SB. Prader-Willi syndrome: genetic, behavioral and treatment issues. *Child Adolesc Psychiatr Clin North Am.* 1996; 5:913-927.
- Dykens EM. Are jigsaw puzzle skills 'spared' in persons with Prader-Willi syndrome? *J Child Psychol Psychiatry*. 2002 Mar;43(3):343-52.
- Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*. 2008 Sep; 57(9):2280-7.
- Egecioglu E, Jerlhag E, Skibicka S, Salomé N, Haage D, Bohlooly-YM, et al. Ghrelin increases intake of palatable food in rodents. *Addict Biol.* 2010;15(3):304–11. 120.
- Ekblad E, Sundler F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides*. 2002 Feb;23(2):251-61.

- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. 1998 Dec;21(6):1375-85.
- Emerick, J.E. & Vogt, K.S. (2013) Endocrine manifestations and management of Prader-Willi syndrome. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2013, 14.
- English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2984.
- Evans S, Pamuklar Z, Rosko J et al., "Gastric bypass surgery restores meal stimulation of the anorexigenic gut hormones glucagon-like peptide-1 and peptide YY independently of caloric restriction," *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*, vol. 26, no. 4, pp. 1086–1094, 2012.
- Farooqi IS, Bullmore E, Keogh J, Gillard J, O'Rahilly S & Fletcher PC. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science* 2007 317 1355.
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 1999 Sep 16;341(12):879-84.
- Fenske, W.K., Bueter, M., Miras, A.D., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., le Roux, C.W., 2012. Exogenous peptide YY3-36 and Exendin-4 further decrease food intake, whereas octreotide increases food intake in rats after Roux-en-Y gastric bypass. *Int. J. Obes.* 36 (3), 379–384.
- Figlewicz DP, Bennett JL, Naleid AM, Davis C, Grimm JW. Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. *Physiol Behav.* 2006;89(4):611–6.
- Figlewicz DP, Benoit SC. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(1):R9–R19.
- Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 2003; 964(1):107–15. 95.
- Folgueira C, Seoane LM, and Casanueva FF, "The brainstomach connection," *Frontiers of Hormone Research*, vol. 42, pp. 83–92, 2014.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E. & McHugh, P.R. (1975) "MiniMental State": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12, 189–198.
- Friedman JM. Modern science versus the stigma of obesity. *Nat Med* 2004; 10: 563–569.
- Fu, J., Kim, J., Oveisi, F., Astarita, G., Piomelli, D., 2008. Targeted enhancement of oleylethanolamide production in proximal small intestine induces across-mealsatiety in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R45–R50.
- Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E., Piomelli, D., 2005. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* 48, 1147–1153.
- Fu-Cheng X, Anini Y, Chariot J, Castex N, Galniche JP, Rozé C. Mechanisms of peptide YY release induced by an intraduodenal meal in rats: neural regulation by proximal gut.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316:129-39.
- Gantz I, Erondy N, Mallick M, Musser B, Krishna R, Tanaka WK, Snyder K, Stevens C, Stroh MA, Zhu H. Efficacy and safety of intranasal peptide yy3-36 for weight reduction in obese adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1754–1757.

- Gargantini, E.; Grande, C.; Trovato, L.; Ghigo, E.; Granata, R. The role of obestatin in glucose and lipid metabolism. *Horm. Metab. Res.* 2013, 45, 1002–1008.
- Garner, D.M., Olmsted, M.P., Bohr, Y. et al. (1982) The eating attitudes test: psychometric features and clinical correlates. *Psychological Medicine*, 12, 871–878.
- Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience* 2009; 159 (4): 1193-9.
- Ghatei MA, Uttenthal LO, Bryant MG, Christofides ND, Moody AJ & Bloom SR. Molecular forms of glucagon-like immunoreactivity in porcine intestine and pancreas. *Endocrinology* 1983 112 917–923.
- Gibbs J. Young RC. Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology.* 1973; 84:488-95.
- Gimenez-Palop, O., Gimenez-Perez, G., Mauricio, D. et al. (2004) A lesser postprandial suppression of plasma ghrelin in Prader-Willi syndrome is associated with low fasting and a blunted postprandial PYY response. *Clinical Endocrinology*, 66, 198–204.
- Goldstone, A.P. (2006) The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. *Progress in Brain Research*, 153, 57–73.
- Goldstone, A.P. Hypothalamic neuropeptides and regulation of fat mass in Prader-Willi syndrome. In *Prader-Willi Syndrome as a Model for Obesity* (Eiholzer, U. et al., eds), pp. 31–43, Karger. 2003.
- Goldstone, A.P. Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87, 927– 937.
- Goldstone, A.P., Holland, A.J., Butler, J.V. et al. (2012) Appetite hormones and the transition to hyperphagia in children with Prader-Willi syndrome. *International Journal of Obesity*, 12, 1564–1570.
- Goldstone, A.P., Patterson, M., Kalingag, N. et al. (2005) Fasting and postprandial hyperghrelinemia in Prader-Willi syndrome is partially explained by hypoinsulinemia, and is not due to peptide YY3-36 deficiency or seen in hypothalamic obesity due to craniopharyngioma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 2681–2690.
- Goldstone, A.P., Thomas, E.L., Brynes, A.E. et al. (2004) Elevated fasting plasma ghrelin in Prader-Willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 1718–1726.
- Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J.M., Bilbao, A., DelArco, I., et al.(2002). A peripheral mechanism for CB1cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J. Neurosci.* 22, 9612–9617.
- Griebel, G., Stemmelin, J., Scatton, B., 2005. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol.Psychiatry* 57, 261–267.
- Griffin K, Franklin D (Can diet pills damage my heart? *Health* (Time Inc Health) 11:20.1997).
- Grosshans M, Vollmert C, Vollstadt-Klein S, Tost H, Leber S, Bach P, Buhler M, Von Der Goltz C, Mutschler J, Loeber S et al. Association of leptin with food cue-induced activation in human reward pathways. *Archives of General Psychiatry* 2012 69 529–537.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJS, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res.* 1997;48(1):23–9. 111.
- Gunay-Aygun M, Heeger S, Schwartz S, Cassidy SB. Delayed diagnosis in patients with Prader-Willi syndrome due to maternal uniparental disomy 15. *Am J Med Genet.* 1997 Jul 11; 71(1):106-10.
- Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O’Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics.* 2001 Nov;108(5):E92.

- Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahrén B & Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 1992 326 1316–1322.
- Hagan MM, Castaneda E, Sumaya IC, Fleming SM, Galloway J, Moss DE. The effect of hypothalamic peptide YY on hippocampal acetylcholine release in vivo: implications for limbic function in binge-eating behavior. *Brain Res.* 1998 Sep 14; 805(1-2):20-8.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998 Aug;1(4):271-2.
- Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Diano S, Horvath TL, Culler MD. A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. *Neuroendocrinology.* 2005;81(5):339-49. Epub 2005 Oct 5.
- Han MS, Kim WW, Oh JH. Results of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) at 1 year in morbidly obese Korean patients. *Obes Surg.* 2005; 15:1469–75.
- Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, Wellner N, Diep TA, Rehfeld JF, et al. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1409–17.
- Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, Jørgensen JO. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002 Feb;56(2):203-6.
- Haqq AM, Muehlbauer M, Svetkey LP, Newgard CB, Purnell JQ, Grambow SC, Freemark MS. Altered distribution of adiponectin isoforms in children with Prader-Willi syndrome (PWS): association with insulin sensitivity and circulating satiety peptide hormones. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Dec; 67(6):944-51. Epub 2007 Jul 30.
- Haqq AM, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Weigle DS, Frayo RS, LaFranchi SH, Cummings DE, Purnell JQ. Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octreotide therapy in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Aug; 88(8):3573-6.
- Haqq, A.M., Grambow, S.C., Muehlbauer, M. et al. (2008) Ghrelin concentrations in Prader-Willi syndrome (PWS) infants and children: changes during development. *Clinical Endocrinology*, 69, 911–920.
- Haqq, A.M., Muehlbauer, M.J., Newgard, C.B. et al. (2011) The metabolic phenotype of Prader-Willi syndrome (PWS) in childhood: heightened insulin sensitivity relative to body mass index. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, E225–E232.
- Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-9.
- Hentges, S.T., Low, M.J., Williams, J.T., 2005. Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *J. Neurosci.* 25, 9746–9751.
- Hill SW, McCutcheon NB. Contributions of obesity, gender, hunger, food preference, and body size to bite size, bite speed, and rate of eating. *Appetite.* 1984 Jun; 5(2):73-83.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005 Jan; 11(1):90-4.
- Hisadome K, Reimann F, Gribble FM, Trapp S. Leptin directly depolarizes preproglucagon neurons in the nucleus tractus solitarius: electrical properties of glucagon-like peptide 1 neurons. *Diabetes.* 2010;59(8):1890–8.
- Hökfelt T, Rehfeld JF, Skirboll L, Ivemark B, Goldstein M, Markey K (1980) Evidence for coexistence of dopamine and CCK in mesolimbic neurones. *Nature* 285:476–478.

- Holdstock C, Engström BE, Öhrvall M, Lind L, Sundbom M, and Karlsson FA, "Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 88, no. 7, pp. 3177–3183, 2003.
- Holland AJ, Treasure J, Coskeran P, Dallow J, Milton N, Hillhouse E. Measurement of excessive appetite and metabolic changes in Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993 Sep; 17(9):527-32.
- Holland AJ, Whittington JE, Butler J, Webb T, Boer H, Clarke D. Behavioural phenotypes associated with specific genetic disorders: evidence from a population-based study of people with Prader-Willi syndrome. *Psychol Med*. 2003 Jan; 33(1):141-53.
- Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*. 1993 Feb; 91(2):398-402.
- Holsen, L.M., Savage, C.R., Martin, L.E. et al. (2012) Importance of reward and prefrontal
- Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006;51(6):801–10. 96.
- Hommer DW, Stoner G, Crawley JN, Paul SM, Skirboll LR (1986) Cholecystokinin-dopamine coexistence: electrophysiological actions corresponding to cholecystokinin receptor subtype. *J Neurosci* 6:3039–3043.
- Horvath TL, Castaneda T, Tang-Christensen M, Pagotto U, Tschöp MH. Ghrelin as a potential anti-obesity target. *Curr 1045 Pharm Des* 2003; 9: 1383-95.
- Howard, A. D.; Feighner, S. D.; Cully, D. F.; Arena, J. P.; Liberator, P. A.; Rosenblum, C. I.; Hamelin, M.; Hreniuk, D. L.; Palyha, O. C.; Anderson, J.; Paress, P. S.; Diaz, C.; Chou, M.; Liu, K. K.; McKee, K. K.; Pong, S. S.; Chaung, L. Y.; Elbrecht, A.; Dashkevich, M.; Heavens, R.; Rigby, M.; Sirinathsinghji, D. J.; Dean, D. C.; Melillo, D. G.; Patchett, A. A.; Nargund, R.; Griffin, P. R.; DeMartino, J. A.; Gupta, S. K.; Schaeffer, J. M.; Smith, R. G.; Van der Ploeg, L. H. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996, 273, 974–977.
- Høybye C, Hilding A, Jacobsson H, Thorén M. Growth hormone treatment improves body composition in adults with Prader-Willi syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 May; 58(5):653-61.
- Ikemoto S, Glazier BS, Murphy JM, et al. Role of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens in mediating reward. *J Neurosci* 1997;17:8580–8687.
- Inui A, Asakawa A, Bowers CY et al., "Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ," *The FASEB Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 439–456, 2004.
- Ionut V, Burch M, Youdim A, and Bergman RN, "Gastrointestinal hormones and bariatric surgery-induced weight loss," *Obesity*, vol. 21, no. 6, pp. 1093–1103, 2013.
- Izzo AA, Piscitelli F, Capasso R, Aviello G, Romano B, Borrelli F, et al. Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 451-61.
- Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C et al., "Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in nondiabetic subjects," *Obesity Surgery*, vol. 22, no. 7, pp. 1084–1096, 2012.
- Jager G, Witkamp RF. The endocannabinoid system and appetite: relevance for food reward. *Nutr Res Rev* 2014; 27: 172-85.
- Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Engel JA. Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation accumbal dopamine release and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010; 211(4):415– 22.

- Jerlhag E, Eggecioglu E, Dickson SL, Andersson M, Svensson L, Engel JA. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol.* 2006;11(1):45–54.
- Jerlhag E, Eggecioglu E, Dickson SL, et al., “Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens,” *Addiction Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 6–16, 2007.
- Jerlhag E, Eggecioglu E, Landgren S, Salome N, Heilig M, Moechard D, et al. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *PNAS.* 2009; 106(27):11318–23. 118.
- Jones TE, Basilio JL, Brophy PM, McCammon MR, Hickner RC. Long-term exercise training in overweight adolescents improves plasma peptide YY and resistin. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Jun;17(6):1189-95. Epub 2009 Feb 26.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006; 444:840-6.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999 Feb; 20(1):68- 100.
- Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 2000 Mar; 141(3):1011-6.
- Karamanakos SN, Vagenas K, Kalfarentzos F & Alexandrides TK. Weight loss, appetite suppression, and changes in fasting and postprandial ghrelin and peptide-YY levels after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a prospective, double blind study. *Annals of Surgical Oncology* 2008 247 401–407.
- Karra E, O’Daly OG, Choudhury AI, Yousseif A, Millership S, Neary MT, et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J Clin Invest* 2013; 123: 3539-51.
- Kellum JM, Kuemmerle JF, O’Dorisio TM et al., “Gastrointestinal hormone responses to meals before and after gastric bypass and vertical banded gastroplasty,” *Annals of Surgery*, vol. 211, no. 6, pp. 763–770, 1990.
- Kellum, J.M. et al. (1990) Gastrointestinal hormone responses to meals before and after gastric bypass and vertical banded gastroplasty. *Ann. Surg.* 211, 763–770 23.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2548-5.
- Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 1995 Aug; 136(8):3585-96.
- Kipnes, M.S., Hollander, P., Fujioka, K., Gantz, I., Seck, T., Erondur, N., Shentu, Y., Lu, K., Suryawanshi, S., Chou, M., Johnson-Levonas, A.O., Heymsfield, S.B., Shapiro, D., Kaufman, K.D., Amatruda, J.M., 2010. A one-year study to assess the safety and efficacy of the CB1R inverse agonist taranabant in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 12, 517–531.
- Kirkham TC, Williams CM. Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology.* 2001;153(2):267–70.
- Kishida K, Funahashi T, and Shimomura I, Adiponectin as a routine clinical biomarker, *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 28, no. 1, pp. 119–130, 2014.
- Kissileff HR, Van Itallie TB. Physiology of the control of food intake. *Annu Rev Nutr.* 1982;2:371-418.

- Kobelt, P. et al. (2006) Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. *Gut* 55, 788–792.
- Koda S, Date Y, Murakami N, Shimbara T, Hanada T, Toshinai K, Nijima A, Furuya M, Inomata N, Osuye K, Nakazato M. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3–36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* 2005, 146:2369-2375.
- Kokkinos, A., le Roux, C.W., Alexiadou, K. et al. (2010) Eating slowly increases the postprandial response of the anorexigenic gut hormones, peptide YY and glucagon-like peptide-1. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95, 333–337.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS* 1065 2008 Mar 12;3(3):e1797.
- Korner J, Inabnet W, Febres G et al., “Prospective study of gut hormone and metabolic changes after adjustable gastric banding and Roux-en-Y gastric bypass,” *International Journal of Obesity*, vol. 33, no. 7, pp. 786–795, 2009.
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*. 1987 Dec 5; 2(8571):1300-4.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 1998 May 7;393(6680):72-6.
- Krugel U, Schraft T, Kittner H, Kiess W, Illes P. Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *Eur J Pharmacol*. 2003;482(1–3):185–7.
- Laferrere, B., Teixeira, J., McGinty, J., et al., 2008. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (7), 2479–2485.
- Lambert, D.M., Vandevoorde, S., Diependaele, G., Govaerts, S.J., Robert, A.R., 2001. Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia* 42, 321–32.
- Lan H, Vassileva G, Corona A, Liu L, Baker H, Golovko A, et al. GPR119 is required for physiological regulation of glucagon-like peptide-1 secretion but not for metabolic homeostasis. *J Endocrinol* 2009; 201:1058–66.
- Langer FB, Bohdjalian A, Felberbauer FX, Fleischmann E, Reza Hoda MA, Ludvik B, et al. Does gastric dilation limit the success of sleeve gastrectomy as a sole operation for morbid obesity? *Obes Surg*. 2006 Feb; 16(2):166 -171.
- Larhammar D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept*. 1996 Sep 16; 65(3):165-74.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Jessop DS. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*. 1997 Oct; 138(10):4445-55.
- Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009 May; 58(5):1058-66.
- Le Merrer J, Becker JA, Befort K, et al. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 2009;89:1379–1412.
- Le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJB, Patterson M, Borg CM, Wynne KJ, Kent A, Vincent RP, Gardiner J, Ghatei MA. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology* 2006; 147:3–8.



- Le Roux, C.W. et al. (2006) Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann. Surg.* 243, 108–114 24.
- Ledikwe JH, Ello-Martin JA, Rolls BJ. Portion sizes and the obesity epidemic. *Journal of Nutrition* 2005 Apr; 135(4):905-909.
- Lee WJ, Chen CY, Chong K, Lee YC, Chen SC, and Lee SD, “Changes in postprandial gut hormones after metabolic surgery: a comparison of gastric bypass and sleeve gastrectomy,” *Surgery for Obesity and Related Diseases*, vol. 7, no. 6, pp. 683–690, 2011.
- Leshan RL, Opland DM, Louis GW, Leininger GM, Patterson CM, Rhodes CJ, et al. Ventral tegmental area leptin receptor neurons specifically project to and regulate cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons of the extended central amygdala. *J Neurosci.* 2010;30(16):5713–23.
- Levine AS, Morley JE, Gosnell BA, Billington CJ, Bartness TJ. Opioids and consummatory behavior. *Brain Res Bull.* 1985 Jun;14(6):663-72.
- Lin HC, Chey WY, Zhao X. Release of distal gut peptide YY (PYY) by fat in proximal gut depends on CCK. *Peptides.* 2000 Oct;21(10):1561-3.
- Lin HC, Chey WY. Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul Pept.* 2003 Jul 15;114(2-3):131-5.
- Liu, J.; Prudom, C. E.; Nass, R.; Pezzoli, S. S.; Oliveri, M. C.; Johnson, M. L.; Veldhuis, P.; Gordon, D. A.; Howard, A. D.; Witcher, D. R.; Geysen, H. M.; Gaylenn, B. D.; Thorner, M. O. Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, 93, 1980–1987.
- LoVerme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:708–16.
- Lovshin J, Estall J, Yusta B, Brown TJ, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 action in the murine central nervous system is enhanced by elimination of GLP-1 receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15; 276(24):21489-99. Epub 2001 Mar 21.
- Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Ranchelli A, Fatone C, Taglioni C, Fanelli C, Santeusano F, De Feo P. Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans. *J Endocrinol Invest.* 2004 May;27(5):RC12-5.
- Maccarrone, M., Pauselli, R., Di Rienzo, M., Finazzi-Agrò, A., 2002. Binding, degradation and apoptotic activity of stearoylethanolamide in rat C6 glioma cells. *Biochem. J.* 366, 137–144 Cota D, 2007.
- Mah PM, Wittert GA. Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 25; 316(2):180-6.
- Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behaviour. *Cell Metab* 2008; 7: 400-9.
- Mantzoros CS, Ozata M, Negrao AB, Suchard MA, Ziotopoulou M, Caglayan S. Synchronicity of frequently sampled thyrotropin (TSH) and leptin concentrations in healthy adults and leptin-deficient subjects: evidence for possible partial TSH regulation by leptin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:3284-91.
- Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, et al. Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated
- Matias, I., Di Marzo, V., 2007. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 27–37.
- Matias, I., Di Marzo, V., 2007. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 27–37.

- McAllister, C.J., Whittington, J.E., Holland, A.J. et al. (2011) Development of the eating behaviour in Prader-Willi Syndrome: advances in our understanding. *International Journal of Obesity (Lond)*, 35, 188–197.
- McFarlane, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Zhao, T.J., 2014. Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, bodyweight, or response to high-fat diet. *Cell Metab.* 20 (1), 54–60.
- McGowan MK, Andrews KM, Grossman SP. Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol Behav.* 1992 Apr;51(4):753-66.
- Melissas J, Koukouraki S, Askoxylakis J, Stathaki M, Daskalakis M, Perisinakis K & Karkavitsas N. Sleeve gastrectomy: a restrictive procedure? *Obesity Surgery* 2007 17 57–62.
- Mingrone, G. et al. (2012) Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 366, 1577–1585.
- Miras AD and le Roux CW, “Mechanisms underlying weight loss after bariatric surgery,” *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, vol. 10, no. 10, pp. 575–584, 2013.
- Møller N, Nygren J, Hansen TK, ØRskov H, Frystyk J & Nair KS. Splanchnic release of ghrelin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003 88 850–852.
- Monaghan KG, Wiktor A, Van Dyke DL. Diagnostic testing for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: a cost comparison. *Genet Med.* 2002 Nov-Dec; 4(6):448-50.
- Monteleone P, Matias I, Martiadis V, et al., “Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 30, no. 6, pp. 1216–1221, 2005.
- Monteleone P, Piscitelli F, Scognamiglio P, et al., “Hedonic eating is associated with increased peripheral levels of ghrelin and the endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol in healthy humans: a pilot study,” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 97, no. 6, pp. E917–E924, 2012.
- Moran TH, Baldessarini AR, Salorio CF, Lowery T, Schwartz GJ. Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):R1245–51.
- Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, Schwartz GJ. Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 2):R618–25.
- Morinigo, R. et al. (2006) GLP-1 PYY, hunger and satiety after gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1735–1740.
- Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Kim F, Schwartz MW. Leptin signaling in the hypothalamic arcuate nucleus is a key determinant of glucose tolerance and hepatic insulin action. *Obes Res.* 2005;13(1):201.
- Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS. Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides.* 2005;26(11):2274–9.
- Nannipieri M, Baldi S, Mari A et al., “Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: mechanisms of diabetes remission and role of gut hormones,” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 98, no. 11, pp. 4391–4399, 2013.
- Näslund E, King N, Mansten S, Adner N, Holst JJ, Gutniak M, Hellström PM. Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *Br J Nutr.* 2004 Mar;91(3):439-46.
- Naslund, E. et al. (1999) GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon and PYY release in humans. *Am. J. Physiol.* 277, 910–916.

- Neary MT, Batterham RL. Peptide YY: food for thought. *Physiol Behav.* 2009 Jul 14; 97(5):616-9. Epub 2009 Mar 4.
- Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep; 306(3):948-53. Epub 2003 May 15.
- O'Sullivan SE, Kendall DA (2010). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* 215:611–616.
- Oesch S, Rüegg C, Fischer B, Degen L & Beglinger C. Effect of gastric distension prior to eating on food intake and feelings of satiety in humans. *Physiology & Behavior* 2006 87 903–10.
- Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, et al. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011- 2012. *JAMA* 2014; 311:806–814.
- Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol.* 1954; 47 (6):419-27.
- Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes.* 1994 Apr;43(4):535-9.
- Osman JL, Sobal J. Chocolate cravings in American and Spanish individuals: biological and cultural influences. *Appetite* 2006; 47: 290-301.
- Otsuka R, Tamakoshi K, Yatsuya H, Murata C, Sekiya A, Wada K, Zhang HM, Matsushita K, Sugiura K, Takefuji S, OuYang P, Nagasawa N, Kondo T, Sasaki S, Toyoshima H. Eating fast leads to obesity: findings based on self-administered questionnaires among middle-aged Japanese men and women. *J Epidemiol.* 2006 May;16(3):117-24.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, et al. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metabolism* 2006;3:167–75.
- Ozcan, B.; Negggers, S. J.; Miller, A. R.; Yang, H. C.; Lucaites, V.; Abribat, T.; Allas, S.; Huisman, M.; Visser, J. A.; Themmen, A. P.; Sijbrands, E.; Delhanty, P.; Van der Lely, A. J. Does des-acyl ghrelin improve glycemic control in obese diabetic subjects by decreasing acylated ghrelin levels? *Eur. J. Endocrinol.* 2014, 170, 799–807.
- Padwal, R., S. K. Li, et al. Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. 2003; *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD004094.
- Paik, K.H., Jin, D.K., Lee, K.H. et al. (2007) Peptide YY, chole- cystokinin, insulin and ghrelin response to meal did not change, but mean serum levels of insulin is reduced in children with Prader-Willi syndrome. *Journal of Korean Medical Science*, 22, 436–441.
- Pannacciulli N, Le DS, Salbe AD, Chen K, Reiman EM, Tataranni PA, Krakoff J. Postprandial glucagon-like peptide-1 (GLP-1) response is positively associated with changes in neuronal activity of brain areas implicated in satiety and food intake regulation in humans. *Neuroimage.* 2007 Apr 1; 35(2):511-7.
- Papailiou J, Albanopoulos K, Toutouzas KG, Tsigris C, Nikiteas N & Zografos G. Morbid obesity and sleeve gastrectomy: how does it work? *Obesity Surgery* 2010 20 1448–1455.
- Pasquali R, Cantobelli S, Casimirri F, Capelli M, Bortoluzzi L, Flamia R, Labate AM, Barbara L. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns of body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Aug; 77(2):341-6.
- Pasquali R, Gagliardi L, Vicennati V, Gambineri A, Colitta D, Ceroni L, Casimirri F. ACTH and cortisol response to combined corticotropin releasing hormone-arginine vasopressin stimulation in obese males and its relationship to body weight, fat distribution and parameters of the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999 Apr; 23(4):419-24.

- Pavón, F.J., Serrano, A., Pérez-Valero, V., Jagerovic, N., Hernández-Folgado, L., Bermúdez-Silva, F.J., Macías, M., Goya, P., de Fonseca, F.R., 2008. Central versus peripheral antagonism of cannabinoid CB1 receptor in obesity: effects of LH-21, a peripherally acting neutral cannabinoid receptor antagonist, in Zucker rats. *J. Neuroendocrinol.* 20, 116–123.
- Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, et al. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry.* 2010;67(9):880–6.
- Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B et al., “Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial,” *Obesity Surgery*, vol. 22, no. 5, pp. 740–748, 2012.
- Peterli R, Woelnerhanssen B, Peters T et al., “Improvement in glucose metabolism after bariatric surgery: comparison of laparoscopic roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective randomized trial,” *Annals of Surgery*, vol. 250, no. 2, pp. 234–241, 2009.
- Piomelli D. A fatty gut feeling. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:332–41.
- Pi-Sunyer, F. X., L. J. Aronne, et al. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *Jama* 2006; 295(7): 761-75.
- Pittner RA, Moore CX, Bhavsar SP, Gedulin BR, Smith PA, Jodka CM, Parkes DG, Paterniti JR, Srivastava VP, Young AA. Effects of PYY[3-36] in rodent models of diabetes and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Aug; 28(8):963-71.
- Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med.* 1996; 334:777-83.
- Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev* 2012; 70:3–21.
- Purtell, L., Sze, L., Loughnan, G. et al. (2011) In adults with Prader-Willi syndrome, elevated ghrelin levels are more consistent with hyperphagia than high PYY and GLP-1 levels. *Neuropeptides*, 45, 301–307.
- Quillan JM, Sadee W, Wei ET, et al. A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH2 fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function. *FEBS Lett* 1998;428:59–62.
- Raben A, Tagliabue A & Astrup A. The reproducibility of subjective appetite scores. *British Journal of Nutrition* 1995 73 517–530.
- Rachon D, Teede H. Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 25; 316(2):172-9.
- Ravussin E, Tschöp M, Morales S, Bouchard C, Heiman ML. Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep; 86(9):4547-51. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Dec; 86(12):5972.
- Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316:165-71.
- Rigamonti AE, Giordani C, Bonomo SM, Cella SG, Müller EE. Early tolerance to the hypophagic effect of the cannabinoid receptor antagonist SR141716 does not impede blockade of an orexigenic stimulus. *Eur J Pharmacol* 2006; 542: 116-20.
- Rigamonti, A.E., Agosti, F., Compri, E. et al. (2013) Anorexi- genic postprandial responses of PYY and GLP1 to slow ice cream consumption: preservation in obese adolescents, but not in obese adults. *European Journal of Endocrinology*, 168, 429–436.
- Rizzello M, Abbatini F, Casella G, et al. Early postoperative insulin-resistance changes after sleeve gastrectomy. *Obes Surg.* 2010; 20:50–5.

- Robert Koch Institut. (1998) Bundes-Gesundheitssurvey 1998. Questionnaire, Berlin.
- Roberts RE, Glicksman C, Alaghband-Zadeh J, Sherwood RA, Akuji N, le Roux CW. The relationship between postprandial bile acid concentration, GLP-1, PYY and ghrelin. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Jan;74(1):67-72. doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03886.x.
- Rodriquez de Fonseca, F. (2000) Peripheral versus central effects of GLP-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 79, 709–711.
- Rolls ET. Sensory processing in the brain related to the control of food intake. *Proc Nutr Soc*. 2007; 66:96–112.
- Rolls, B. J., P. M. Van Duijvenvoorde, et al. Variety in the diet enhances intake in a meal and contributes to the development of obesity in the rat. *Physiol Behav* 1983 31(1): 21-7.
- Rolls, E. T. Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361(1471): 1123-36
- Rolls BJ, Rowe EA, Rolls ET. How sensory properties of foods affect human feeding behavior. *Physiol Behav*. 1982; 29: 409–417.
- Rolls, E. T. Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol Behav* 2005; 85(1): 45-56.
- Ross, R.A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br.J.Pharmacol.* 140, 790-801. doi:10.1038/sj.bjp.0705467.
- Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord* 2013; 14: 387-407.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., et al. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br.J. Pharmacol.* 152, 1092-1101. doi:10.1038/sj.bjp.0707460
- Scholtz S, Miras AD, Chhina N et al., “Obese patients after gastric bypass surgery have lower brain-hedonic responses to food than after gastric banding,” *Gut*, vol. 63, no. 6, pp. 891–902, 2014.
- Schrander-Stumpel CT, Curfs LM, Sastrowijoto P, Cassidy SB, Schrander JJ, Fryns JP. Prader-Willi syndrome: causes of death in an international series of 27 cases. *Am J Med Genet A*. 2004 Feb 1;124A(4):333-8.
- Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, et al. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 2008; 8:281–8.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*. 1992 Aug; 13(3):387-414.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control and food intake. *Nature*. 2000 Apr 6; 404(6778):661-71.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Seeley, R.J., Barsh, G.S., Baskin, D.G., Leibel, R.L., 2003. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* 52 (2), 232–238.
- Seetho IW, Jones G, Thomson GA, Fernando DJ (Treating diabetes mellitus in Prader-Willi syndrome with Exenatide. *Diabetes Research & Clinical Practice* 92:e1-2.2011).
- Shiromani, P.J. et al. (2012) Chapter 14 – Pharmacological treatment of obesity. In *Sleep Loss and Obesity: Intersecting Epidemics*. pp. 203–225, Springer.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1996 Nov;137(11):5159-62.
- Silecchia G, Boru C, Pecchia A, et al. Effectiveness of laparoscopic sleeve gastrectomy (first stage of biliopancreatic diversion with duodenal switch) on co-morbidities in super-obese high-risk patients. *Obes Surg*. 2006; 16:1138–44.
- Silver AJ, Flood JF, Song AM, Morley JE. Evidence for a physiological role for CCK in the regulation of food intake in mice. *Am J Physiol*. 1989 Mar; 256(3 Pt 2):R646-52.

- Simonian HP, Kresge KM, Boden GH, Parkman HP. Differential effects of sham feeding and meal ingestion on ghrelin and pancreatic polypeptide levels: evidence for vagal efferent stimulation mediating ghrelin release. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 348-54.
- Sink, K.S., McLaughlin, P.J., Wood, J.A., Brown, C., Fan, P., Vemuri, V.K., Peng, Y., Olszewska, T., Thakur, G.A., Makriyannis, A., Parker, L.A., Salamone, J.D., 2008. The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology* 33, 946–955.
- Sjostrom, L., 2013. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial: a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J. Intern. Med.* 273 (3), 219–234.
- Sjostrom, L., Lindroos, A.K., Peltonen, M., et al., 2004. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N. Engl. J. Med.* 351 (26), 2683–2693.
- Skibicka KP, Hansson C, Egecioglu E, Dickson SL. Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addict Biol.* 2012 Jan;17(1):95-107
- Sloth B, Davidsen L, Holst JJ, Flint A, Astrup A. Effect of subcutaneous injections of PYY1–36 and PYY3–36 on appetite, ad libitum energy intake, and plasma free fatty acid concentration in obese males. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 293:E604-E609.
- Smeets AJ, Soenen S, Luscombe-Marsh ND, Ueland Ø, Westerterp-Plantenga MS. Energy expenditure, satiety, and plasma ghrelin, glucagon-like peptide 1, and peptide tyrosinetyrosine concentrations following a single high-protein lunch. *J Nutr.* 2008 Apr; 138(4):698-702.
- Steinert RE, Poller B, Castelli MC, Drewe J, Beglinger C. Oral administration of glucagon-like peptide 1 or peptide YY 3–36 affects food intake in healthy male subjects. *Am J Clin Nutr* 2010, 92:810-817.
- Stevenson DA, Anaya TM, Clayton-Smith J, Hall BD, Van Allen MI, Zori RT, Zackai EH, Frank G, Clericuzio CL. Unexpected death and critical illness in Prader-Willi syndrome: report of ten individuals. *Am J Med Genet A.* 2004 Jan 15; 124A(2):158-64.
- Stunkard AJ, Sorensen T, Hanis C (1986). An adoption study of human obesity, *New Engl J Med*, 314: 193-8.
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(22):7973-81. PubMed PMID: 14585959.
- Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 824305.
- Sweeney TE and Morton JM, “Metabolic surgery: action via hormonal milieu changes, changes in bile acids or gut microbiota? A summary of the literature,” *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, vol. 28, pp. 727–740, 2014.
- Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, et al. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr* 2004;7:123–146.
- Sze, L., Purtell, L., Jenkins, A. et al. (2011) Effects of a single dose of exenatide on appetite, gut hormones, and glucose homeostasis in adults with Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, E1314–E1319.
- Tam, J., Cinar, R., Liu, J., Godlewski, G., Wesley, D., Jourdan, T., Szanda, G., Mukhopadhyay, B., Chedester, L., Liow, J.S., Innis, R.B., Cheng, K., Rice, K.C., Deschamps, J.R., Chorvat, R.J., McElroy, J.F., Kunos, G., 2012. Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab.* 16, 167–179.
- Tam, J., Vemuri, V.K., Liu, J., Bátkai, S., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S.V., Pickel, J., Makriyannis, A., Kunos, G., 2010. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J. Clin. Invest.* 120, 2953–2966.

- Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Rømer J, Vrang N. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med*. 2000 Jul; 6(7):802-7.
- Tauber, M., Conte Auriol, F., Moulin, P. et al. (2004) Hyperghrelinemia is a common feature of Prader-Willi syndrome and pituitary stalk interruption: a pathophysiological hypothesis. *PA. Hormone Research*, 62, 49–54.
- Terra X, Auguet T, Guiu-Jurado E et al., “Long-term changes in leptin, chemerin and ghrelin levels following different bariatric surgery procedures: Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy,” *Obesity Surgery*, vol. 23,no. 11,pp. 1790–1798,2013.
- Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*. 1993 Nov; 42(11):1678-82.
- Travagli RA, Hermann GE, Browning KN, Rogers RC. Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:279–30.
- Tsai AG, Wadden TA. Systematic review: an evaluation of major commercial weight loss programs in the United States. *Ann Intern Med* 2005; 142:56–66.
- Tscöhp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-9.
- Turer AT and Scherer PE, Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications, *Diabetologia*, vol. 55, no. 9, pp. 2319– 2326, 2012
- Turton MD, O’Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996 Jan 4; 379(6560):69-72.
- Ukkola O. Ghrelin and insulin metabolism. *Eur J Clin Invest*. 2003 Mar;33(3):183-5.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 Feb;18(2):158-68.
- Valenti M, Vigano` D, Casico MG, Rubino T, Steardo L, Parolaro D, et al. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 945-50.
- Van Gaal, L. F., A. M. Rissanen, et al. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005 365(9468): 1389-97.
- Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP, Näslund E, Beglinger C, Hellström PM, Long SJ, Morgan LM, Holst JJ, Astrup A. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep; 86(9):4382-9.
- Verty ANA, McGregor IS, Mallet PE. The dopamine receptor antagonist SCH 23390 attenuates feeding induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Brain Res*. 2004;1020(1–2):188–95.
- Verty, A.N., McFarlane, J.R., McGregor, I.S., Mallet, P.E., 2004. Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. *Endocrinology* 145, 3224–3231.
- Vidal J, Ibarzabal A, Romero F, et al. Type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome following sleeve gastrectomy in severely obese subjects. *Obes Surg*. 2008; 18:1077–82.
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet* 2001; 357 (9253) :354-7
- Wang X, Miyares RL, Ahern GP. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurons, induces visceral pain and reduces food intake via TRPV1. *J Physiol (Lond)* 2005; 564:541–7.

- Wang YC, McPherson K, Marsh T, et al. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 2011; 378:815–825.
- Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* 1995 Jan 30; 358(3):219-24.
- Whittington J, Holland A, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H. Cognitive abilities and genotype in a population-based sample of people with Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 2004 Feb; 48(Pt 2):172-87.
- Whittington JE, Holland AJ, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H. Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK Health Region. *J Med Genet.* 2001 Nov; 38(11):792-8.
- Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jan; 81(1):327-32.
- Woelnerhanssen B, Peterli R, Steinert RE, Peters T, Borbély Y, and Beglinger C, “Effects of postbariatric surgery weight loss on adipokines and metabolic parameters: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy—a prospective randomized trial,” *Surgery for Obesity and Related Diseases*, vol. 7, no. 5, pp. 561–568, 2011.
- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec; 86(12):5992.
- Yada T, Dezaki K, Sone H, et al. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev.* 2008; 4:18–23.
- Yang, J. et al. (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite stimulating peptide hormone. *Cell* 132, 387–396.
- Yanovski SZ and Yanovski JA, “Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 311, no. 1, pp. 74–86, 2014.
- Yeomans MR, Blundell JE and Leshem M, “Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite?” *British Journal of Nutrition*, vol. 92 no. Suppl 1, pp. S3– S14, 2004.
- Yim CC, Mogenson GJ (1991) Electrophysiological evidence of modulatory interaction between dopamine and cholecystokinin in the nucleus accumbens. *Brain Res* 541:12–20.
- Yousseif A, Emmanuel J, Karra E et al., “Differential effects of laparoscopic sleeve gastrectomy and laparoscopic gastric bypass on appetite, circulating acyl-ghrelin, peptide YY3-36 and active GLP-1 levels in non-diabetic humans,” *Obesity Surgery*, vol. 24, no. 2, pp. 241–252, 2014.
- Zhang, J. V.; Ren, P. G.; Avsian-Kretchmer, O.; Luo, C. W.; Rauch, R.; Klein, C.; Hsueh, A. J. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005, 310, 996–999.
- Zhang, M., C. Balmadrid, et al. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. *Behav Neurosci* 2003; 117(2): 202-11.
- Zheng H and Berthoud HR, “Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism,” *Physiology*, vol. 23, pp. 75-83, 2008.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2006; 494(3):528–48.





