

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI
Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Mediche Cliniche Sperimentali

CICLO XXIII

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

La fenotipizzazione di modelli murini tramite metodiche di imaging PET e CT rivela l'importanza di nuovi processi patofisiologici alla base della disregolazione metabolica associata ad obesità.

S.S.D. Endocrinologia MED13

Coordinatore: Prof. Enzo Bonora

Tutor: Dott. Uberto Pagotto

Tesi presentata da: Dott. Carmelo Quarta

Sommario

ABBREVIAZIONI.....	4
INTRODUZIONE E SCOPI.....	6
CAPITOLO 1- Obesita' e regolazione dell'omeostasi energetica.....	9
1.1- Obesita' ed alterazioni patofisiologiche.....	9
1.2 -Appetito ed omeostasi energetica, regolazione centrale e periferica.....	10
1.3-Sistema nervoso simpatico e metabolismo energetico.....	12
CAPITOLO 2- Il tessuto adiposo bruno e l'obesita'.....	14
2.1- Il tessuto adiposo bruno, caratteristiche fondamentali.....	14
2.2- Il tessuto adiposo bruno come nuovo target farmacologico contro l'obesita'....	16
2.3- Tessuto adiposo bruno e disregolazione metabolica nell'obesita'.....	18
CAPITOLO 3- Sistema endocannabinoide e l'obesita'.....	19
3.1- Endocannabinoidi ed obesita'.....	19
3.2- Meccanismi di controllo del metabolismo energetico.....	20
3.2.1 Endocannabinoidi e comportamento alimentare.....	20
3.2.2 Endocannabinoidi e contributo degli organi periferici.....	21
3.2.3 Endocannabinoidi, BAT e termogenesi.....	22
3.2.4 Endocannabinoidi e disregolazioni metaboliche nell'obesita'.....	24
3.3- Terapia dell'obesita' con farmaci CB1 antagonisti.....	25

CAPITOLO 4- Imaging molecolare e valutazione del metabolismo.....27

4.1- Imaging molecolare con PET e TAC: principi di base.....27

4.2- La PET come nuovo strumento per studiare il metabolismo energetico.....29

4.3- Tomografi per piccoli animali e potenzialita' nella ricerca contro l'obesita'30

CAPITOLO 5- Modelli animali e metodi utilizzati.....31

5.1- Ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione del metabolismo.....31

5.1.1 Modelli animali utilizzati.....31

5.1.2 Isolamento dell'RNA ed analisi con Real Time PCR.....32

5.1.3 In situ Real Time PCR.....34

5.1.4 Ibridazione in situ.....34

5.1.5 Immunoistochimica ed immunofluorescenza.....35

5.1.6 Western Blot.....36

5.1.7 Analisi del comportamento alimentare.....36

5.1.8 Misurazione di ormoni e metaboliti.....37

5.1.9 Quantificazione del tessuto adiposo con microCT.....37

5.1.10 Analisi della spesa energetica e della temperatura corporea.....38

5.1.11 Analisi del DNA mitocondriale e dell'attività della citrato sintasi.....39

5.1.12 Studi con Small Animal PET/CT.....39

5.1.13 Procedure di simpatectomia.....41

5.1.14 Analisi statistica.....41

5.2-Tessuto adiposo bruno e controllo della sensibilita' insulinica.....41

5.2.1 Modelli animali utilizzati41

5.2.2 Studi con Small Animal PET/CT in assenza di bilanciamento glicemico.....42

5.2.3 Studi con Small Animal PET/CT in condizioni di euglicemia.....42

5.2.4 Analisi statistica.....43

CAPITOLO 6- Risultati e conclusioni: il sistema endocannabinoide e l'obesita'.....44

6.1- Caratterizzazione anatomica dell'espressione del recettore CB1 nei modelli animali utilizzati.....44

6.2-Valutazione del fenotipo degli animali alimentati con dieta standard.....45

6.3-Valutazione del fenotipo degli animali alimentati con dieta ipercalorica.....46

6.4-Analisi dell'omeostasi energetica degli animali.....48

6.5-Valutazione della termogenesi e della funzionalita' del BAT.....49

6.6-Dimostrazione del ruolo svolto dal SNS nel determinare il fenotipo degli animali.....50

6.7- CONCLUSIONI.....52

CAPITOLO 7- Risultati e conclusioni: Tessuto adiposo bruno e controllo della sensibilita' insulinica.....54

7.1-Analisi della funzionalita' del BAT con PET/CT in animali con obesità indotta da dieta.....54

7.2-Valutazione della sensibilità insulinica nel BAT tramite PET/CT imaging in condizioni di euglicemia.....55

7.3-CONCLUSIONI.....56

CAPITOLO 8- Considerazioni finali.....58

BIBLIOGRAFIA59

ANNEX.....66

FIGURE.....70

ABBREVIAZIONI

BAT, tessuto adiposo bruno

CB1, recettore 1 dei cannabinoidi

COX IV, cytochrome c oxidase IV

Cyt c, cytochrome c

DBH, dopamina beta idrossilasi

ECS, sistema endocannabinoide

ECs, endocannabinoidi

FFA, acidi grassi liberi

GLP-1, glucagon-like peptide 1

HDL, lipoproteine ad alta densita'

HFD, dieta grassa

KO, knockout

LDL, lipoproteine a bassa densita'

LH, area laterale dell'ipotalamo

NE, noradrenalina

NRF-1, nuclear respiratory factor-1

NTS, nucleo del tratto solitario

PET, tomografia ad emissione di positroni

PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α

PNS, sistema nervoso periferico

PVN, nucleo paraventricolare dell'ipotalamo

PYY, peptide YY

RQ, quoziente respiratorio

SD, dieta standard

SHFD, dieta super grassa

SNC, sistema nervoso centrale

SNS, sistema nervoso simpatico

SUV, standardized uptake value

TAC, tomografia assiale computerizzata

Tfam, mitochondrial transcription factor A

UCP-1, uncoupling protein 1

WT, wild type

INTRODUZIONE E SCOPI

Lo studio e la caratterizzazione dei processi patogenetici alla base dell'obesità si basa sempre di più sull'impiego di modelli animali di malattia, quali topi geneticamente modificati per geni coinvolti in specifiche vie metaboliche. In questo contesto, le metodiche di imaging molecolare offrono un importante vantaggio, quello della visualizzazione e quantificazione del processo metabolico attraverso delle immagini, senza quindi la necessità di sacrificare l'animale.

Questa possibilità permette di analizzare ripetutamente gli stessi animali nel tempo, in seguito ad esempio ad un trattamento farmacologico o ad un regime alimentare specifico. In questo modo è possibile quindi ridurre la variabilità inter-individuale nella risposta al trattamento e con essa il numero di animali necessari per ottenere dati sperimentali significativi.

In questo lavoro di tesi viene mostrato come apparecchiature di imaging PET (tomografia ad emissione di positroni) e TAC (tomografia assiale computerizzata) per piccoli roditori, siano funzionali per lo studio del fenotipo di modelli animali di obesità, in quanto capaci di fornire informazioni di natura metabolica (con la PET), o anatomica (per quanto riguarda la TAC), in modo non invasivo.

Queste metodiche di imaging, in associazione ad altre metodiche convenzionali, hanno permesso di ottenere nuove informazioni sui meccanismi di funzionamento di sistemi patofisiologici coinvolti nel controllo dell'omeostasi energetica, e quindi del controllo del peso corporeo.

Il primo progetto di questo dottorato di ricerca ha riguardato lo studio dei meccanismi di controllo del metabolismo energetico da parte del sistema endocannabinoide.

Il sistema endocannabinoide è un sistema fisiologico composto da molecole lipidiche endogene, gli endocannabinoidi, che durante l'obesità va in contro ad una patologica overattivazione e in questo modo contribuisce all'accumulo della massa grassa e alle alterazioni metaboliche ad essa conseguenti negli individui obesi.

Gli endocannabinoidi hanno la proprietà di regolare il metabolismo energetico agendo sia a livello del sistema nervoso centrale, che in tessuti periferici come il tessuto adiposo, il fegato, il pancreas e il muscolo scheletrico. Approcci farmacologici mirati a ripristinare globalmente la normale azione degli endocannabinoidi, si sono rivelati strumenti utili per ridurre l'aumentato peso corporeo e le disregolazioni metaboliche ad esso associate in pazienti obesi. Questi approcci comportano però una controparte di natura psichiatrica, in quanto vanno ad agire anche sul

sistema endocannabinoide presente in centri nervosi cerebrali coinvolti nel controllo dell'emozione e della gratificazione associata all'assunzione del cibo.

Una possibilità per preservare gli effetti positivi di questi farmaci senza tuttavia andare incontro agli effetti collaterali, potrebbe essere quella di agire selettivamente ripristinando il normale funzionamento degli endocannabinoidi in tessuti periferici, senza intaccare le strutture nervose centrali responsabili degli eventi avversi psichiatrici. Tuttavia, prima di ipotizzare trattamenti farmacologici specifici, è necessario essere a conoscenza degli esatti meccanismi attraverso cui gli endocannabinoidi regolano l'omeostasi energetica, e quale sia il ruolo svolto dalle diverse sedi anatomiche su cui queste molecole agiscono.

Sulla base di questa esigenza, il primo progetto del dottorato ha riguardato lo studio del fenotipo di topi knockout per il recettore 1 degli endocannabinoidi (recettore CB1), il quale media l'azione di controllo degli endocannabinoidi sul metabolismo energetico. A partire dallo studio del fenotipo di topi con delezione totale di CB1, e di topi conditional knockout che presentano delezione del recettore esclusivamente in alcune popolazioni cellulari neuronali, si è cercato di capire quali siano i meccanismi alla base della capacità degli endocannabinoidi di regolare l'omeostasi energetica. Inoltre, confrontando il fenotipo dei due diversi modelli animali, è stato valutato se l'azione degli endocannabinoidi a livello dei neuroni ipotalamici è importante nel controllare il bilancio energetico e conseguentemente il peso corporeo durante l'obesità.

Il secondo progetto del dottorato ha riguardato lo studio della relazione esistente tra tessuto adiposo bruno, sensibilità insulinica ed obesità. Il tessuto adiposo bruno è un tessuto che recentemente è emerso come importante sito di controllo del metabolismo, infatti l'attività funzionale di questo tessuto sembra contribuire a ridurre la capacità di accumulare l'energia contenuta nel cibo e quindi contrastare l'accumulo di massa grassa e peso corporeo in seguito ad alimentazione ipercalorica. La recente dimostrazione che gli esseri umani posseggono delle aree metabolicamente attive di tessuto adiposo bruno in vita adulta, permette di ipotizzare che eventuali approcci farmacologici mirati ad attivare questo tessuto possano essere effettivi nel ridurre la massa grassa ed il peso corporeo in pazienti obesi.

Un aspetto ancora sconosciuto di questo tessuto è la sua capacità di rispondere alla azione dell'insulina. Dati preliminari ottenuti *in vitro*, sembrerebbero evidenziare che il tessuto adiposo bruno ha una forte capacità di rispondere alla azione dell'ormone, e che in condizioni di obesità la sensibilità insulinica in questo tessuto può risultare compromessa. Alla luce della potenziale

importanza di questo tessuto nel controllo dell'azione dell'insulina, in questo lavoro si è voluto valutare *in vivo*, la sensibilità insulinica del tessuto in condizioni fisiologiche e di obesità indotta da dieta. A questo scopo, attraverso imaging molecolare PET e TAC, è stata studiata la capacità dell'insulina di stimolare l'uptake di glucosio nel tessuto adiposo bruno di topi normali (magri, alimentati con dieta alimentare standard) ed in topi con obesità indotta da dieta.

CAPITOLO 1- Obesità' e regolazione dell'omeostasi energetica

1.1 Obesità e alterazioni patofisiologiche

L'obesità è una patologia multifattoriale le cui principali conseguenze negative per la salute includono alterazioni a livello del sistema cardiocircolatorio quali infarto del miocardio e ictus, diabete mellito tipo 2, ed alcune forme di tumore. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha messo in luce come l'obesità rappresenti un importante problema sociale, stimando che vi siano complessivamente 300 milioni di soggetti obesi (BMI > 30, body mass index espresso in kg/m²) e più di un miliardo di soggetti in sovrappeso (BMI maggiore di 24.9) (1). Il sovrappeso e l'obesità derivano da un disequilibrio nella gestione del metabolismo energetico da parte dell'organismo; il nostro corpo infatti, gestisce ciclicamente una certa quantità di energia in entrata che deriva dal cibo ingerito e spende parte di questa energia per far fronte al funzionamento dei vari sistemi fisiologici in condizioni basali o in condizioni attive (come l'attività fisica). Questo processo viene definito bilancio energetico.

La quantità di energia in eccesso che non viene utilizzata può essere immagazzinata (tipicamente sotto forma di grasso) e se l'immagazzinamento è eccessivo si va incontro ad obesità.

Un'aumentata condizione di immagazzinamento (e l'aumento di peso conseguente), può derivare da un aumentato introito di energia (quindi aumentata assunzione di calorie dal cibo), da una ridotta capacità di consumare l'energia assunta, o da entrambe. L'accumulo di grasso e di peso comporta una serie di disregolazioni metaboliche tra le quali la resistenza insulinica è una delle più conosciute.

L'insulino-resistenza consiste nell'incapacità dell'insulina di produrre i suoi effetti biologici a livello cellulare, di tessuto e di organo. I siti del recettore insulinico, particolarmente a livello di muscolo scheletrico, fegato e tessuto adiposo, diventano quindi insensibili all'azione dell'ormone e per far fronte a questa insufficienza l'organismo produce più insulina (iperinsulinemia).

Tre ipotesi cercano di spiegare perchè l'accumulo di grasso e di peso corporeo comporti disregolazioni metaboliche come la resistenza insulinica (2). In base alla teoria dello "stato infiammatorio" l'obesità rappresenterebbe uno stato infiammatorio cronico nel quale molecole infiammatorie prodotte dai macrofagi infiltrati negli adipociti produrrebbero cambiamenti patologici in beta cellule pancreatiche e tessuti sensibili all'insulina. Secondo la teoria

“dell’eccesso lipidico” invece, l’obesità risulta in un aumento degli accumuli ectopici lipidici in diverse sedi a causa della ridotta capacità del tessuto adiposo di accumulare grasso. Questi accumuli produrrebbero effetti citotossici ad esempio nel fegato e nelle beta cellule pancreatiche. Infine è stata anche proposta “l’ipotesi delle adipochine” che prevede come, in seguito all’espansione dei depositi di grasso, le cellule adipose vadano incontro ad una alterazione della loro ben nota capacità’ di produrre fattori endocrini (adipochine) e questo indurrebbe un’alterazione metabolica dei tessuti target cui sulle quali queste molecole agiscono.

1.2 Appetito ed omeostasi energetica, regolazione centrale e periferica

Il bilancio energetico viene controllato da un complesso insieme di sistemi fisiologici in equilibrio che forniscono segnali di sazietà e fame al cervello e che regolano la capacità dell’organismo di consumare energia. Molti distretti anatomici possono svolgere diverse funzioni in questo contesto, e in particolare il sistema nervoso centrale (SNC) svolge sicuramente un ruolo dominante di controllo dello stato metabolico, influenzando l’attività di altri sistemi e ricevendo informazioni da essi. L’ipotalamo ad esempio è sottoposto ad un flusso continuo di segnali provenienti dalle aree cerebrali superiori e dalla periferia, dotati di azione oressizzante o anoressizzante, che lo informano in tempo reale circa le condizioni energetico-nutrizionali dell’organismo.

L’ipotalamo può poi direttamente controllare il metabolismo energetico, producendo neuropeptidi che possono modulare sia il comportamento alimentare che la spesa energetica degli organi periferici.

Nel controllo della funzione ipotalamica un contributo importante è fornito dalla leptina, un ormone prodotto dalle cellule adipose. Questo ormone, agendo su specifici neuroni dell’ipotalamo, determina una risposta catabolica dell’organismo, ovvero una riduzione dell’introito calorico e un aumento del dispendio energetico.

Altre molecole prodotte dall’apparato gastrointestinale regolano invece nel breve termine l’appetito interagendo con l’ipotalamo ed altri centri cerebrali. La ghrelina ad esempio è un ormone prodotto dallo stomaco i cui livelli nel sangue aumentano prima del pasto per poi calare rapidamente nella fase post prandiale. La sua azione a livello ipotalamico è opposta a quella della leptina, ovvero attiva la via anabolica (aumentando cioè l’introito alimentare e riducendo il

dispendio energetico). Molti altri peptidi prodotti dall'intestino influenzano in modo diverso il comportamento alimentare agendo a livello del SNC e i più conosciuti tra questi sono colecistochinina (CCK), glucagon-like peptide 1 (GLP-1) e peptide YY (PYY), molecole che hanno la proprietà comune di regolare il comportamento alimentare a multipli livelli (3).

Il tessuto adiposo svolge un ruolo importante nella regolazione complessiva del metabolismo energetico. Il tessuto adiposo bianco rappresenta la forma classica di tessuto adiposo e si distingue anatomicamente e funzionalmente dal tessuto adiposo bruno (nella sezione successiva verranno descritte in dettaglio le differenze tra i due tessuti).

Il tessuto adiposo bianco ha la funzione principale di immagazzinare energia accumulata sotto forma di grasso per il successivo utilizzo da parte dei vari organi. Inoltre, come descritto precedentemente per il caso della leptina, questo tessuto può rilasciare mediatori chiamati adipochine che agiscono su organi target a distanza o che possono agire in modo paracrino ed autocrino. Benché siano state identificate più di cinquanta adipochine con diversi ruoli funzionali, l'adiponectina e la leptina sono indubbiamente le più ampiamente studiate. L'adiponectina è un' importante citochina che ha azioni protettive nella patogenesi dell'obesità in quanto riduce gli effetti negativi della dislipidemia, migliora la resistenza insulinica e le alterazioni vascolari associate a questa patologia (4, 5). Accanto al ruolo classico di immagazzinamento dell'energia, nuove evidenze sperimentali indicano come il tessuto adiposo possa avere anche proprietà ossidative e possa quindi influenzare la capacità sull'organismo di consumare l'energia assunta con la dieta. È stato evidenziato infatti che il tessuto adiposo bianco può incrementare la sua capacità ossidativa grazie ad una plastica modificazione del contenuto dei suoi mitocondri (6).

Il fegato è un altro importante mediatore del metabolismo, poiché in condizioni cataboliche (cioè dopo avere assunto il cibo) le cellule epatiche accumulano glucosio sotto forma di glicogeno e di acidi grassi a lunga catena che vengono convertiti poi in trigliceridi. In questo momento specifico la capacità del tessuto di consumare energia grazie all'ossidazione di acidi grassi è ridotta. In condizioni postprandiali invece, la direzione di questi pathways è invertita, il fegato produce glucosio, non più trigliceridi, ed aumenta la sua capacità di ossidazione degli acidi grassi. Un ruolo chiave che il fegato ha nel regolare il bilancio energetico deriva quindi dalla sua capacità di gestire questo ciclo di immagazzinamento e consumo dell'energia. Inoltre,

questo tessuto è particolarmente coinvolto nel determinare alcune disregolazioni metaboliche associate all'obesità.

Per esempio, uno dei problemi principali dovuti all'obesità è la dislipidemia plasmatica che consiste in elevati livelli di trigliceridi e di colesterolo LDL (lipoproteine a bassa densità) e ridotti livelli di colesterolo HDL (lipoproteine ad alta densità). Una patologica produzione di colesterolo LDL da parte del fegato sembra essere un difetto cruciale nell'individuo obeso e probabilmente deriva dalla alterata sensibilità insulinica originata dall'accumulo di grasso corporeo (7).

Il muscolo scheletrico ha notoriamente un ruolo importante di regolazione del metabolismo del glucosio, è infatti ben nota l'azione dell'insulina su questo tessuto ed è ormai un'evidenza nella comunità scientifica che la resistenza insulinica a livello del muscolo scheletrico rappresenta un fattore patogenetico importante associato al fenotipo obeso. Oltre al ruolo di regolazione del metabolismo glucidico, il muscolo scheletrico è un importante sito coinvolto nella regolazione dell'ossidazione lipidica nell'individuo obeso. E' stato visto infatti come l'obesità comporti una riduzione dell'abilità del muscolo scheletrico di ossidare i lipidi (8), un difetto che potrebbe essere critico nel determinare la suscettibilità di alcuni individui a diventare obesi (9).

1.3 Sistema nervoso simpatico e metabolismo energetico

Il sistema nervoso simpatico (SNS) è un fattore chiave nella regolazione del bilancio energetico, agendo sia a livello centrale sulla regolazione del senso della fame e della sazietà, sia attraverso la regolazione della spesa energetica nei tessuti periferici. Recenti evidenze sperimentali indicano come questo sistema possa avere un ruolo nella patogenesi dell'obesità.

Il SNS agisce su due principali tipi di recettori, i recettori α e β fra cui i recettori α sono localizzati sui vasi sanguigni ed hanno un' importante funzione di controllo dell'attività cardiovascolare, mentre i recettori β possono regolare non solo la funzione cardiovascolare ma anche il metabolismo energetico.

I recettori beta adrenergici si suddividono in tre sottotipi (β_1 , β_2 , β_3), e interagiscono con i propri ligandi endogeni, rappresentati dalle tre catecolamine plasmatiche: noradrenalina (NE), adrenalina e dopamina.

Fra questi recettori, il tipo β_3 sembra essere maggiormente coinvolto nella regolazione del bilancio energetico, avendo una maggiore affinità per la noradrenalina ed essendo espresso in diversi tessuti coinvolti nella regolazione del metabolismo come tessuto adiposo, intestino, cervello, muscolo scheletrico, fegato (10, 11).

Il SNS periferico agisce a livello di questo recettore principalmente attraverso meccanismi NE dipendenti, regolando comportamento alimentare e spesa energetica; indici di attività simpatica periferica come il turnover della NE nel tessuto adiposo bruno (vedi paragrafo successivo) sono inversamente correlati con la quantità di cibo ingerita in modelli animali (12). Inoltre, topi knockout in cui il recettore β_3 viene selettivamente eliminato nel tessuto adiposo bianco, esibiscono una ridotta assunzione di cibo (13), indicando come l'attività funzionale periferica del SNS possa indurre ipofagia agendo a livello di tessuti periferici.

Il SNS periferico stimola la spesa energetica e sebbene diversi studi effettuati su animali siano piuttosto concordanti in questo senso, non è ancora chiaro quale sia l'effettiva capacità del SNS di regolare la spesa energetica nell'uomo (11).

Un importante contributo del SNS nel controllo del peso corporeo potrebbe essere dato dalla capacità di questo sistema di regolare la termogenesi indotta dalla dieta; infatti questo sistema potrebbe essere importante nel regolare la combustione sotto forma di calore del cibo ingerito durante i pasti. E' noto come, negli animali, il SNS ed in particolar modo il recettore β_3 adrenergico possano influenzare la capacità di "bruciare" l'energia contenuta nella dieta attraverso il tessuto adiposo bruno (14) e, sebbene ancora non definitive, alcune evidenze sperimentali indicano come questo fenomeno potrebbe essere regolato anche nell'uomo (11). L'attivazione dei recettori β_3 da parte della NE ha anche un ruolo di stimolazione della lipolisi nel tessuto adiposo e diversi studi indicano come gli individui obesi abbiano una ridotta sensibilità alla lipolisi NE dipendente che potrebbe essere un fattore che contribuisce al mantenimento della condizione di obesità (11).

CAPITOLO 2- Tessuto adiposo bruno ed obesità

2.1 Il tessuto adiposo bruno, caratteristiche fondamentali

Il tessuto adiposo bruno (brown adipose tissue, BAT) rappresenta probabilmente il risultato di un processo evolutivo che ha fornito ai mammiferi la possibilità di sopravvivere a basse temperature ambientali e allo stress termico nel momento della nascita.

Alla base di questa osservazione c'è la constatazione che il BAT possiede la capacità di produrre calore per mantenere stabile la temperatura corporea in seguito a stress termogenici. La termogenesi, nel BAT o in altre sedi, è il risultato della trasformazione dell'energia chimica contenuta nel cibo in calore senza la possibilità che questa energia venga immagazzinata in altre forme. E' evidente quindi che, sebbene classicamente l'attività termogenica del BAT abbia il ruolo di controllare la temperatura corporea, questo tessuto svolge anche un ruolo di regolazione della quantità di energia assunta con il cibo. L'attività metabolica del BAT funge infatti da fattore protettivo nei confronti dell'accumulo di peso corporeo nell'organismo, in quanto consente di ridurre la quantità di energia accumulabile nell'organismo sotto forma di grasso.

Rispetto al tessuto adiposo bianco, il BAT si distingue per possedere un aumentato contenuto mitocondriale. Il grasso bruno si localizza nei roditori generalmente nella regione soprascapolare e a livello mediastinico; è costituito da cellule adipose più piccole rispetto alle cellule bianche (15-60 μm vs 200 μm) in possesso di accumuli lipidici multiloculari (a differenza degli accumuli uniloculari nelle cellule bianche). Infine il BAT si presenta generalmente con una maggiore vascolarizzazione ed innervazione rispetto al grasso bianco.

Sebbene i due tipi di cellule adipose, la bruna e la bianca abbiano la caratteristica comune di potere accumulare nel loro interno gocce lipidiche, sono state identificate molte differenze funzionali tra i due tessuti. La principale funzione del grasso bianco è infatti quella di accumulare energia mentre l'attività del BAT consiste nel dissipare l'energia in eccesso contenuta nell'organismo. Questa funzione unica del BAT è determinata dalla presenza della proteina uncoupling protein-1 (UCP-1, non prodotta nelle cellule bianche), una proteina mitocondriale che modifica la permeabilità della membrana mitocondriale interna permettendo un aumento del tasso di ossidazione dei substrati ed una diminuzione della produzione di ATP.

L'espressione di recettori β_3 adrenergici è un'altra caratteristica importante del BAT e l'attività termogenica di questo tessuto è regolata dal SNS attraverso l'azione della NA su questi recettori. Il principale meccanismo conosciuto di attivazione della termogenesi nel BAT da parte della NA è descritto in figura 1; in condizioni di inattività la proteina termogenetica UCP-1 risulta inibita dai nucleotidi purinici (principalmente l'ATP), quando il BAT risulta attivato da centri cerebrali superiori coinvolti nella regolazione della temperatura, oppure dall'effetto acuto dovuto all'assunzione di cibo, la NE viene rilasciata dai terminali simpatici che innervano il tessuto. Nell'adipocita maturo questo comporta l'idrolisi dei trigliceridi accumulati nel tessuto e il rilascio di acidi grassi liberi (free fatty acids, FFA), che attivano la proteina UCP-1 ostacolandone l'iniziale inibizione da parte dell'ATP. Gli stessi FFA liberati all'interno della cellula fungono poi da substrati per la proteina UCP1 che trasforma l'energia in essi contenuta in calore, la conseguente riduzione dei FFA all'interno della cellula richiama a sua volta nuovi lipidi dal circolo sanguigno. La NE induce inoltre il rilascio da parte del BAT della lipoproteina lipasi (LPL) che degrada chilomicroni e colesterolo VLDL nel circolo sanguigno dando origine a FFAs che possono essere ossidati nel tessuto.

Oltre a mediare gli effetti termogenetici del BAT, l'azione della NE sui recettori β_3 adrenergici può determinare la trasformazione di adipociti bianchi in adipociti bruni. E' stato visto infatti che esposizioni prolungate al freddo e trattamenti con farmaci β agonisti possono indurre transdifferenziazione nei roditori (15). Popolazioni cellulari distribuite in modo sparso nel tessuto adiposo bianco ('bright cells') e aventi fenotipo intermedio tra cellule adipose bianche e cellule brune, sembrano fungere da riserva di cellule capaci di convertirsi in cellule brune (16).

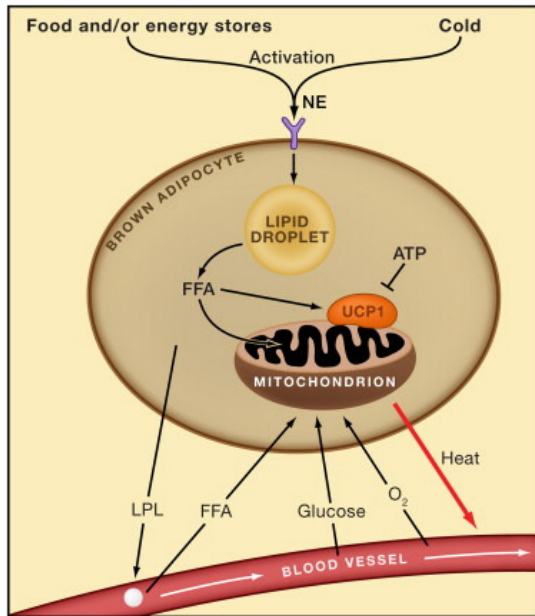


Figura 1:
Regolazione dell'attivazione termogenica del BAT da parte della noradrenalina.

2.2 Il tessuto adiposo bruno come putativo target farmacologico contro l'obesità

La presenza del BAT veniva considerata fino a pochi anni fa come una caratteristica peculiare dei roditori e degli esseri umani in età neonatale ma non degli esseri umani in vita adulta, in quanto si pensava che questo tessuto scomparisse o diventasse inattivo dopo i primi anni di vita. Studi molto recenti hanno dimostrato, tramite metodiche non invasive PET/CT (vedi capitolo 4), che gli esseri umani possono mantenere in vita adulta delle aree funzionalmente attive di BAT che si possono attivare in seguito ad esposizione al freddo (17, 18). Questa importante dimostrazione ha suscitato particolare interesse in quanto la possibilità di manipolare questo tessuto nell'uomo potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico nel controllare l'equilibrio energetico ed il peso corporeo. Diverse evidenze sperimentali ottenute su modelli animali indicano come l'attività metabolica del BAT possa regolare l'efficienza metabolica ed il peso corporeo e molti studi condotti finora su modelli animali sono concordi nel dimostrare che l'assenza dell'attività funzionale di UCP-1 nel grasso bruno sia sufficiente per indurre obesità o per aumentarne la sua progressione (19). La possibilità di ridurre l'energia accumulata dalla dieta

sotto forma di grasso, grazie ad una attivazione della funzionalità termogenetica del grasso bruno, è di particolare interesse in quanto sembrerebbe rappresentare un approccio che non rispetta la teoria “dell’adipostat/lipostat control”. Secondo questa teoria infatti, un aumentato dispendio di energia nell’organismo produrrebbe fenomeni compensatori che aumentano il senso della fame attraverso un meccanismo principalmente mediato dalla leptina. Tuttavia, come discusso da Cannon, questo fenomeno sembra non avvenire nel caso in cui l’energia venga spesa dall’organismo sotto forma di termogenesi. In altre parole la stimolazione dell’attività termogenetica dell’organismo attraverso la manipolazione della funzionalità del BAT, potrebbe portare ad un aumento della spesa energetica (e quindi riduzione di peso) senza che questo effetto positivo sul peso venga contrastato da un aumento compensatorio dell’appetito (20).

Sebbene non esistano evidenze dirette che nell’uomo la termogenesi del BAT sia coinvolta nei meccanismi patogenetici dell’obesità, tutti gli studi relativi alla identificazione con PET/CT delle aree di BAT metabolicamente attive mostrano come la presenza e l’attività metabolica di questo tessuto correli negativamente con l’indice di massa corporea ed il peso corporeo del paziente. E’ ragionevole quindi pensare che questo tessuto abbia un ruolo importante nel regolare il peso corporeo non solo negli animali ma anche negli esseri umani, e che approcci farmacologici mirati ad aumentare l’attività funzionale di questo tessuto possano rappresentare una nuova strategia farmacologica nei confronti dell’obesità.

Un importante aspetto da definire nell’ottica di un approccio terapeutico mirato all’attivazione del BAT è l’effettiva importanza della funzionalità del tessuto in relazione al controllo dell’omeostasi energetica a livello dell’intero organismo. Si stima che gli adulti posseggano in media 100 g di BAT nel corpo ma che questa piccola quantità di tessuto possa, quando attivata, consumare una notevole quantità di energia (circa 3-4 kg di grasso bianco in un anno).

Non tutti gli studi finora pubblicati su questo argomento hanno tuttavia trovato una relazione tra attivazione del BAT e modificazione della termogenesi o della spesa energetica negli esseri umani (21) e un ulteriore aspetto indubbiamente da chiarire è se gli esseri umani al pari dei roditori posseggano bright cells nel grasso bianco capaci di trasformarsi in cellule brune.

La possibilità di incrementare la massa di grasso bruno inducendo transdifferenziazione a partire dalle cellule bianche potrebbe rappresentare infatti un ulteriore approccio terapeutico.

2.3 Tessuto adiposo bruno e disregolazione metabolica nell'obesità

Come descritto precedentemente, un' importante proprietà metabolica del BAT consiste nella possibilità di reclutare ed ossidare lipidi presenti nel circolo plasmatico attraverso l'attività della lipoproteina lipasi (figura 1). L'innalzamento plasmatico dei valori di trigliceridi circolanti e colesterolo che spesso si riscontra in individui obesi può costituire un fattore di rischio importante per patologie cardiovascolari. Uno studio recente dimostra come il BAT rappresenti un organo importante per la clearance dei trigliceridi plasmatici. E' stato dimostrato nel topo che l'attivazione del BAT con brevi esposizioni al freddo produce un drastico consumo di trigliceridi nel tessuto che a sua volta determina una profonda riduzione dei livelli circolanti di lipidi plasmatici. Questa proprietà del BAT risulta essere funzionale nel ridurre livelli patologicamente alterati di lipidi plasmatici in modelli murini di obesità indotta da dieta (22). Un'altra potenziale azione positiva che il BAT potrebbe avere nei confronti delle disregolazioni metaboliche che si osservano nell'obesità è rappresentata dalla sua capacità di rispondere all'azione dell'insulina, essendo uno dei tessuti più sensibili alla stimolazione dell'uptake di glucosio mediata dall'insulina in modelli animali (23).

Al pari del muscolo scheletrico, l'azione dell'insulina sul BAT ha un forte impatto sulla clearance del glucosio a livello dell'intero organismo, infatti topi transgenici privati del recettore per l'insulina esclusivamente nel BAT sono soggetti ad alterazioni generali del metabolismo del glucosio (21). Sebbene si conosca ancora molto poco circa il ruolo dell'insulina nel regolare il BAT negli esseri umani, informazioni preliminari indicano che, al pari degli animali, l'insulina può stimolare l'uptake di glucosio nel BAT allo stesso livello del muscolo scheletrico in individui adulti sani (21). Sebbene questi dati sembrano anticipare un ruolo importante del BAT nel regolare gli effetti dell'insulina, non è del tutto chiaro se questa proprietà del tessuto risulti modificata nell'obesità. Esistono infatti solo dati indiretti che supportano questa possibilità, come ad esempio la constatazione che modelli animali di obesità presentano una riduzione dell'espressione di GLUT4, uno dei fattori principali cellulari che mediano l'azione dell'insulina sull'uptake del glucosio (14).

CAPITOLO 3- Sistema endocannabinoide ed obesità

3.1 Endocannabinoidi ed obesità

Gli endocannabinoidi (ECs) sono molecole lipidiche prodotte a partire dal metabolismo degli acidi grassi che agiscono come ligandi endogeni principalmente a livello di due recettori: il recettore dei cannabinoidi di tipo 1 (CB1) o il recettore dei cannabinoidi di tipo 2 (CB2).

I più conosciuti e studiati endocannabinoidi sono N-arachidonoiletanolamina (AEA), o anandamide, e 2-arachidonoil glicerolo (2-AG). Complessi meccanismi enzimatici regolano la sintesi e la degradazione di queste molecole endogene; nel complesso, gli enzimi coinvolti nella regolazione della biodisponibilità degli endocannabinoidi insieme agli stessi ECs ed ai loro recettori, costituiscono quello che viene definito il sistema endocannabinoide (ECS) (24). Gli ECs svolgono una lunga serie di effetti biologici molti dei quali coinvolgono i neuroni e sono dovuti alla proprietà di queste molecole di fungere da neurotrasmettitori. Differentemente dai canonici neurotrasmettitori gli ECs non vengono immagazzinati a livello di vescicole dopo la loro sintesi, ma piuttosto prodotti a richiesta (*‘on demand’*) a partire da lipidi della membrana post-sinaptica. Dopo essere stati prodotti, gli ECs possono diffondere nella membrana presinaptica ed agire regolando sia in modo eccitatorio che in modo inibitorio la trasmissione del segnale nervoso nel SNC e nel sistema nervoso periferico (SNP).

Il sistema endocannabinoide, grazie all'azione sul recettore CB1, interviene a vari livelli anatomici e attraverso diversi meccanismi sia centrali che periferici che verranno elucidati nella sezione successiva,

In questo modo, esso è in grado di influenzare il comportamento alimentare, il metabolismo dei lipidi e del glucosio, la spesa energetica totale nell'organismo, svolgendo quindi un importante ruolo di controllo del metabolismo energetico.

Il recettore CB1 e altre componenti dell'ECS sono funzionalmente attivi non solo nei vari distretti neuronali del SNC e del SNP ma anche a livello non neuronale in svariati tessuti periferici come il fegato, il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico, il pancreas e l'apparato gastrointestinale.

E' ormai noto come l'obesità si possa associare ad una iper-regolazione del sistema endocannabinoide in quanto comporta un aumento dei livelli circolanti/tissutali di ECs e del

recettore CB1, che rappresenta il recettore degli endocannabinoidi maggiormente coinvolto nella relazione patofisiologica esistente tra ECS ed obesità.

Le evidenze sperimentali circa una up-regolazione dell'ECS nell'obesità sono molteplici e aumentati livelli di ECs sono stati riscontrati nell'ipotalamo di topi obesi (25). Inoltre, pare evidente da studi su animali e pazienti obesi che l'obesità produce una overattivazione del ECS a livello di organi periferici come il tessuto adiposo bianco (26-28), il BAT (29), il fegato (30), il pancreas (26) e il muscolo scheletrico (31).

L'iperattivazione del ECS durante l'obesità sembra essere alla base del mantenimento della massa grassa e del peggioramento delle condizioni metaboliche negli individui obesi. Per questo motivo approcci farmacologici, mirati ad inibire il recettore CB1, dimostrano di essere efficaci nel ridurre peso corporeo e disregolazioni metaboliche in questi individui, ma producono anche reazioni avverse dannose per la salute. Le possibilità di applicazione di farmaci inibitori del recettore CB1 verranno descritte nella sezione finale di questo capitolo.

3.2 Meccanismi di controllo del metabolismo energetico

3.2.1 Endocannabinoidi e comportamento alimentare

Complessivamente, il ruolo del sistema endocannabinoide nel controllo dell'equilibrio energetico consiste nella capacità di influenzare il comportamento alimentare così come di regolare la spesa energetica e l'accumulo di energia nell'organismo sotto forma di depositi adiposi. Tutte queste funzioni vengono regolate da azioni periferiche e centrali che non solo coinvolgono distretti neuronali, ma svolgono anche una azione diretta su tessuti non neuronali.

Il 'signalling' degli ECs nel cervello è alla base della capacità di queste molecole di stimolare pathways neuronali oressigenici a livello dell'ipotalamo (32), ed è noto che gli endocannabinoidi producono iperfagia agendo direttamente nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN) (33), nell'area laterale dell'ipotalamo (LH) (34), o indirettamente influenzando l'azione di ormoni oressizzanti come la ghrelina (35). L'azione degli ECs a livello del sistema mesolimbico inoltre, ha la capacità di regolare le proprietà gratificanti del cibo influenzando così il desiderio di assumere cibi appetitosi (36).

Recenti evidenze, tuttavia, dimostrano che la capacità degli ECs di regolare il comportamento alimentare attraverso il SNC può dipendere anche da una azione periferica a livello di circuiti

nervosi presenti nell'apparato gastrointestinale che trasmettono segnali di sazietà e di fame a strutture nervose superiori. E' stato dimostrato che l'attivazione del recettore CB1 intestinale da parte degli ECs può modificare l'azione di neuroni vagali localizzati nell'intestino che a loro volta agiscono sul SNC producendo modificazioni del comportamento alimentare (37). L'importanza del ruolo del sistema gastrointestinale nel mediare la risposta iperfagica indotta dagli ECs è stata inoltre confermata da un altro studio in cui si è visto come la proprietà oreogena degli ECs scompaia in modelli animali privati della funzionalità di alcune popolazioni neuronali dell'intestino (38).

3.2.2 Endocannabinoidi e contributo degli organi periferici

Numerose evidenze sperimentali accumulate negli ultimi anni dimostrano come oltre alla funzione classica di regolazione del comportamento alimentare, gli ECs e il recettore CB1 possano influenzare l'attività di organi periferici ed in questo modo produrre modificazioni nella spesa energetica e nella termogenesi a livello dell'intero organismo. Questa proprietà degli ECs emerge dall'osservazione che, somministrando farmaci CB1 antagonisti in modelli animali di obesità indotta da dieta, si ottiene non solo un'effetto ipofagico ma anche un aumento della spesa energetica (39-42), osservazione che è stata riscontrata anche in esseri umani sottoposti a trials clinici mirati a testare l'efficacia del farmaco CB1 antagonista Taranabant (43).

La capacità di influenzare il metabolismo energetico periferico dipende probabilmente da una azione pleiotropica del sistema endocannabinoide a diversi livelli anatomici. Il tessuto adiposo bianco è il distretto anatomico periferico più studiato in questo senso e gli ECs svolgono diversi effetti in corrispondenza dell'adipocita come la promozione di adipogenesi e la stimolazione della sintesi di trigliceridi e dell'uptake di glucosio (44). In accordo con queste proprietà degli ECs, il blocco del recettore CB1 con farmaci antagonisti induce uno stimolo della lipolisi nel tessuto adiposo, fenomeno che potrebbe essere alla base della stimolazione della spesa energetica osservata in seguito al trattamento con questa classe di farmaci.

La stimolata lipolisi nei depositi di grasso infatti, indurrebbe un aumento dei livelli plasmatici di FFAs disponibili per essere ossidati dallo stesso tessuto adiposo e dal muscolo; ciò produrrebbe a sua volta un aumento generalizzato della spesa energetica (44).

I meccanismi di azione che regolano la lipolisi nel tessuto adiposo non sono tuttavia chiari, ad esempio non è chiaro se gli effetti lipolitici di questi farmaci derivino da un'azione diretta del blocco del recettore CB1 espresso sull'adipocita, o siano indirettamente regolati da altri distretti anatomici come ad esempio le terminazioni nervose simpatiche afferenti al tessuto.

Un ruolo diretto di controllo del bilancio energetico attraverso l'influenza sull'attività mitocondriale è ipotizzabile per il recettore CB1 espresso negli adipociti, infatti adipociti in coltura trattati con farmaci CB1 antagonisti esibiscono un' aumentata attività mitocondriale (45) e, in accordo con questo, il trattamento di colture cellulari con CB1 agonisti riduce il contenuto di mitocondri (46).

Come descritto precedentemente, gli adipociti possono avere un ruolo di stimolazione della spesa energetica in alcune condizioni, variando il numero di mitocondri e l'ossidazione dei substrati.

È quindi possibile che il blocco del recettore CB1 espresso sull'adipocita possa indurre un aumento del numero di mitocondri e dell'attività ossidativa del tessuto, influenzando in questo modo la spesa energetica totale.

Il recettore CB1 espresso in altre sedi periferiche come il muscolo scheletrico e il fegato, potrebbe essere un importante mediatore dell' effetto dei farmaci CB1 antagonisti sulla ossidazione lipidica e sulla spesa energetica.

Evidenze *in vitro* dimostrano che il blocco farmacologico di CB1 determina un aumento del consumo di ossigeno nel soleo di animali obesi (47), mentre per il fegato è stato dimostrato che gli ECs epatici sopprimono l'attività dell'enzima carnitina-palmitoiltrasferasi (CPT-1) (48), un importante enzima ad azione stimolatoria su ossidazione lipidica e spesa energetica.

Rimane tuttavia da definire se l'azione degli ECs a livello di questi tessuti abbia un' influenza *in vivo* sul metabolismo generale dell'organismo.

3.2.3 Endocannabinoidi, BAT e termogenesi

Il recettore CB1 potrebbe avere un ruolo di controllo della attività termogenetica dell'organismo attraverso un'azione sul BAT.

È noto che gli endocannabinoidi possono modulare l'attività dei recettori melanocortinici espressi nel sistema nervoso centrale nel PVN (34) e, considerata l'importanza di questi recettori nel controllare la funzionalità simpatica periferica e l'attività del grasso bruno (49, 50), è

possibile che l'interazione dell'ECS con il sistema melanocortinico possa influenzare l'attività metabolica del grasso bruno e la termogenesi.

L'ipotesi che gli ECs siano molecole capaci di regolare BAT e termogenesi non deriva solo da evidenze neuroanatomiche ma è supportata anche da dati funzionali ottenuti su modelli animali. Il blocco farmacologico del recettore CB1 modifica il profilo di espressione genica nel BAT di roditori obesi nella direzione di un aumento dell'ossidazione β -cellulare, dell'attività mitocondriale e della termogenesi (41, 45). Inoltre l'espressione della proteina termogenetica UCP1 risulta ridotta in colture cellulari di adipociti bruni trattati con farmaci CB1 agonisti (51) e uno studio recente dimostra, *in vivo*, che il farmaco CB1 antagonista Rimonabant aumenta l'attività termogenetica del grasso bruno nel ratto (52).

Nel loro insieme queste osservazioni indicherebbero che, nell'obesità, l'overattivazione del ECS potrebbe portare ad una riduzione della attività termogenetica del BAT e quindi ad una riduzione della capacità di trasformare il contenuto calorico della dieta in calore. In questo senso il blocco farmacologico del recettore CB1 potrebbe avere degli effetti antiobesità ripristinando la funzionalità termogenetica del tessuto patologicamente downregolata dagli endocannabinoidi. Questa teoria necessita tuttavia di ulteriori conferme, inoltre non si conosce ancora il ruolo fisiopatologico degli ECs nel regolare BAT e termogenesi negli esseri umani.

Studi recenti mettono in luce alcuni dei meccanismi di azione attraverso cui gli ECs potrebbero regolare la funzionalità del BAT. L'aumentata attività termogenetica del BAT che si osserva in seguito a trattamento di animali con farmaci CB1 antagonisti sembra infatti dipendere dai terminali nervosi simpatici che innervano il tessuto (52).

Tuttavia, le evidenze *in vitro* sopracitate che dimostrano come il blocco farmacologico di CB1 possa indurre un aumento della termogenesi nel BAT in colture cellulari, in assenza quindi di terminali simpatici attivi, sembrerebbero indicare che un effetto diretto sull'adipocita da parte degli ECs potrebbe contribuire a mediare questa risposta.

Uno studio recente, infine, suggerisce come un'ulteriore spiegazione della capacità degli ECs di regolare BAT e termogenesi possa essere la capacità del recettore CB1 di regolare la trasdifferenziazione di cellule adipose bianche in cellule adipose brune (53)

3.2.4 Endocannabinoidi e disregolazioni metaboliche nell'obesità

Gli studi clinici che hanno valutato l'efficacia di nuovi farmaci antagonisti per il recettore CB1 hanno identificato una serie di effetti positivi che questa classe di farmaci può avere non solo in termini di controllo dell'appetito e dell'efficienza metabolica, ma anche a livello delle disregolazioni metaboliche spesso associate all'obesità (54). I farmaci CB1 antagonisti possono infatti indurre un miglioramento del profilo lipidico e del metabolismo del glucosio in pazienti obesi.

Questo miglioramento avviene a discapito della riduzione della massa grassa e del peso corporeo (54, 55, 56), suggerendo un ruolo diretto e non secondario alle modificazioni di peso corporeo e massa grassa, svolto dal blocco del recettore CB1 sul metabolismo lipidico e glucidico dell'individuo obeso.

Il muscolo scheletrico è un potenziale target attraverso il quale gli ECs hanno la capacità di controllare il metabolismo del glucosio e la sensibilità insulinica, infatti l'antagonismo di CB1 aumenta l'uptake di glucosio in miotubi L6 in coltura (57), in colture primarie di cellule muscolari umane (58) e nel muscolo soleo isolati da animali obesi (59). Inoltre l'inibizione o l'attivazione farmacologica di CB1 potenzia o riduce rispettivamente cascate molecolari regolate dall'insulina in colture cellulari di miotubi (60).

Il pancreas endocrino è un tessuto molto responsivo all'azione degli endocannabinoidi, che possono influenzare la secrezione insulinica a questo livello, tuttavia il ruolo del ECS nel regolare questa funzione del pancreas permane non chiaro, esistendo pubblicazioni contraddittorie sull'argomento (61).

L'ECS epatico sembra avere invece un ruolo chiaro e importante nel regolare il profilo metabolico dell'individuo obeso, infatti modelli animali che presentano delezione tessuto specifica del recettore CB1 nel fegato esprimono un fenotipo caratterizzato da una ridotta produzione di lipidi da parte del fegato. Inoltre questi animali risultano protetti dalla steatosi epatica e dall'aumento di trigliceridi plasmatici e di colesterolo che si origina in seguito a somministrazione di dieta ipercalorica (30, 48).

3.3 Terapia dell'obesità con farmaci CB1 antagonisti

Come discusso nella sezione precedente, farmaci CB1 antagonisti testati su modelli animali producono una serie di effetti positivi sull'omeostasi energetica che includono riduzione dello stimolo della fame, riduzione della massa grassa e miglioramento del profilo plasmatico. L'insieme di questi effetti comporta un miglioramento globale della condizione di obesità. Diversi trials clinici hanno testato in esseri umani sovrappeso o obesi l'azione del farmaco CB1 antagonista Rimonabant (il primo in questa classe di farmaci ad essere stato sintetizzato) e tutti gli studi effettuati dimostrano che il farmaco induce una significativa perdita di peso e un miglioramento delle disregolazioni metaboliche nei pazienti testati (62). Sebbene Rimonabant sia stato introdotto nel commercio, un'attenta analisi dei suoi effetti su una larga scala di pazienti ha evidenziato una serie di eventi avversi di natura psichiatrica legati all'utilizzo di questo farmaco come ansia, depressione e tendenze suicidarie (63). A causa di questi effetti negativi il Rimonabant è stato ritirato dal commercio in quanto considerato farmaco non sicuro e tutti i trials clinici mirati a testare l'efficacia di altri farmaci CB1 antagonisti sintetizzati sono stati interrotti.

Le recenti evidenze sperimentali descritte in questo lavoro mettono in luce come la componente periferica del ECS possa avere un ruolo importante nel regolare il metabolismo energetico e lo stimolo della fame. Alla luce di queste evidenze una nuova strategia farmacologica anti obesità sarebbe rappresentata da farmaci che agiscono esclusivamente bloccando il recettore CB1 periferico senza tuttavia cervello andare ad agire a livello cerebrale. Questi farmaci dovrebbero preservare gli effetti positivi sul metabolismo senza tuttavia modificare circuiti del SNC responsabili delle reazioni avverse di natura psichiatrica.

Un farmaco CB1 antagonista selettivo per i tessuti periferici è stato recentemente testato in animali e sembra essere promettente nel regolare peso corporeo e disregolazioni metaboliche originate da obesità indotta da dieta (64).

E' tuttavia da notare che questo farmaco ha la capacità di legare il recettore CB2 oltre al recettore CB1 e che la somministrazione in topi completamente privi del recettore CB1 (topi knockout) induce un cambiamento dell'atteggiamento alimentare in questi animali. Ulteriori studi sulla specificità di questo farmaco saranno quindi necessari per chiarire l'effettivo ruolo svolto dal ECS periferico nel contesto del controllo metabolico generale.

In generale, nella prospettiva di agire farmacologicamente bloccando il recettore CB1 espresso in sedi anatomiche specifiche, è ancora necessario chiarire i meccanismi alla base della capacità del recettore CB1 di influenzare il metabolismo energetico, e le sedi anatomiche maggiormente coinvolte in questa proprietà.

CAPITOLO 4- Imaging molecolare e valutazione del metabolismo.

4.1 Imaging molecolare con PET e TAC: principi di base

L'imaging molecolare si può definire come un insieme di tecnologie le quali permettono di misurare, *in vivo*, processi biologici a livello cellulare e molecolare sia negli uomini che negli animali. A differenza delle metodiche di imaging morfologico (come nel caso della tomografia assiale computerizzata o TAC) queste tecnologie permettono di individuare le anomalie molecolari che sono alla base delle malattie piuttosto che gli effetti macroscopici di tali alterazioni. In base a queste considerazioni l'imaging molecolare è in grado di rivelare una malattia con largo anticipo rispetto alle tecniche diagnostiche convenzionali che forniscono informazioni di tipo morfologico.

La PET (positron emission tomography) è una tecnologia che permette di ottenere informazioni *in vivo* su processi biologici a livello molecolare sia dal punto di vista qualitativo, visualizzando la biodistribuzione del tracciante specifico per la caratterizzazione biologica di una determinata malattia, sia dal punto di vista quantitativo poiché permette di stimare importanti parametri biologici.

Lo studio dei processi metabolici con la PET avviene grazie ad un'iniziale iniezione (per via endovenosa generalmente) di tracciante radioattivo che consiste in una molecola endogena o esogena legata chimicamente ad un isotopo radioattivo emittente positroni. L'isotopo decade, emettendo un positrone (il corrispondente antimateria dell'elettrone), e dopo un breve percorso nello spazio il positrone si annichila con un elettrone, producendo una coppia di fotoni (di energia paragonabile a quella dei raggi gamma) emessi in direzioni opposte fra loro. Questi fotoni sono rilevati quando raggiungono un materiale scintillante nel dispositivo di scansione, dove creano un lampo luminoso, e l'impulso di luce viene poi rivelato ed amplificato da opportuni sensori. Dalla misurazione della posizione in cui i fotoni colpiscono il rivelatore, si può ricostruire la posizione del corpo da cui sono stati emessi, permettendo la determinazione dell'attività o dell'utilizzo chimico all'interno delle parti del corpo investigate. Lo scanner utilizza la rilevazione delle coppie di fotoni per mappare la densità dell'isotopo nel corpo e creare delle coordinate spaziali che potranno essere trasformate in immagini (figura 2).

La possibilità di utilizzare radiofarmaci specifici rende possibile valutare in modo non invasivo diversi processi biologici come il metabolismo del glucosio, variazioni nella densità recettoriale e la perfusione ematica. Per queste caratteristiche la PET viene utilizzata maggiormente a scopi diagnostici ma anche di ricerca per valutare nel tempo malattie neoplastiche, alterazioni neurologiche o patologie cardiache.

Negli ultimi anni tuttavia, grazie alla creazione di specifiche metodiche di quantificazione del segnale e allo sviluppo di nuovi radiofarmaci, tale metodica ha trovato applicabilità anche in campo endocrino-metabolico, in particolar modo nello studio dell'obesità.

Diversamente dalla PET, la TAC fornisce informazioni anatomiche che derivano dall'emissione di un fascio di raggi X da parte di una sorgente che attraversano l'individuo e che vengono assorbiti in modo diverso a seconda della densità del tessuto che incontrano. La quantità di raggi X assorbita dall'organismo viene rilevata e trasformata in una immagine che definisce l'anatomia dell'individuo dato che i diversi strati tissutali appaiono in diverse colorazioni a causa della loro diversa densità.

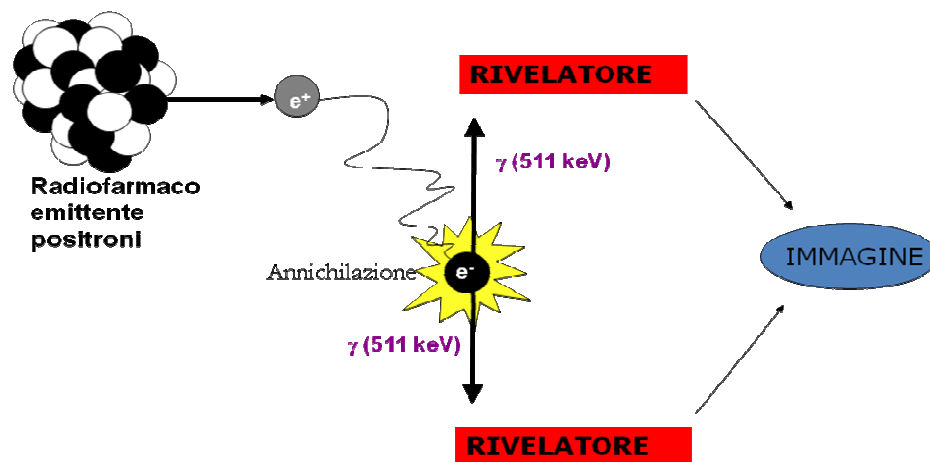


Figura 2:
Principi di rilevazione del segnale emesso da un radiofarmaco emittente positroni con tecnologia PET.

4.2 La PET come nuovo strumento per studiare il metabolismo energetico periferico

Grazie alla validazione di metodi di quantificazione di immagini efficaci nel fornire informazioni sul contenuto e sulla cinetica di accumulo dei traccianti PET all'interno dei tessuti, è possibile utilizzare la PET per studiare in modo non invasivo il metabolismo del glucosio nel cervello (65) ed in tessuti periferici come il muscolo scheletrico (66) e il miocardio (67).

Queste acquisizioni hanno permesso di applicare la tecnologia PET per apprendere nozioni importanti sulla patofisiologia dell'obesità e del diabete.

Ad esempio la PET ha fornito importanti indicazioni nella comprensione del ruolo tessuto specifico del grasso addominale e sottocutaneo nella genesi dell'insulino resistenza (68) e nella valutazione dell'efficacia di importanti farmaci antidiabetici come il rosiglitazone e la metformina in soggetti obesi (69)

Il tracciante PET che può essere utilizzato a tale scopo consiste in una molecola di desossiglucosio legata chimicamente all'isotopo ^{18}F (2-Deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucosio o ^{18}F -FDG), che, dopo essere stata trasportata all'interno della cellula, viene subito fosforilata e rimane "bloccata" in questa forma senza essere ulteriormente metabolizzata.

La fosforilazione iniziale viene effettuata dagli stessi enzimi che agiscono sul glucosio nativo (le esocinasi cellulari) mentre la successiva fosforilazione necessaria per l'ingresso nel ciclo di Krebs, normalmente effettuata dalla glucosio-6P-isomerasi, è impedita a causa dell'ingombro sterico dato dalla presenza di ^{18}F .

Gli enzimi di defosforilazione sono anch'essi impossibilitati ad agire, per cui il risultato finale consiste nella permanenza della molecola radioattiva all'interno della cellula per almeno 1 ora e nella rispettiva rilevazione del segnale tramite PET.

Traccianti PET a base di acidi grassi possono invece essere utilizzati per studiare l'ossidazione beta cellulare. Il tracciante FTHA (^{18}F -fluoro-6-thia-heptadecanoic-acid) ad esempio, consiste in una molecola di acido grasso complessato con l'isotopo ^{18}F che ha la caratteristica di essere trasportato facilmente nei mitocondri di cellule muscolari scheletriche e cardiache e subire uno step iniziale di beta ossidazione che ne garantisce "l'intrappolamento" all'interno della cellula. La valutazione dell'uptake di FTHA nel muscolo scheletrico e nel miocardio fornisce una stima dell'utilizzo degli acidi grassi liberi da parte di questi organi (70).

La disponibilità di traccianti PET che permettono di ottenere informazioni sulla perfusione tissutale come [^{15}O]H₂O, rappresenta un'ulteriore possibilità di applicazione di questa metodica negli studi sul metabolismo e sull'insulino resistenza. La valutazione simultanea dell'uptake di glucosio e della perfusione in distretti anatomici specifici ha permesso ad esempio di studiare il ruolo del flusso sanguigno regionale nella genesi dell'insulino resistenza del soggetto obeso (71).

4.3 Tomografi per piccoli animali e potenzialità nella ricerca contro l'obesità

Per anni i ricercatori hanno utilizzato traccianti radioattivi e autoradiografia su modelli animali, al fine di ottenere informazioni sui meccanismi alla base dello sviluppo e della progressione delle patologie umane. L'utilizzo di queste tecniche ha l'inconveniente di non fornire una reale rappresentazione *in vivo* di processi biologici, inoltre prevedano necessariamente il sacrificio dell'animale e l'analisi post-mortem. La PET per piccoli animali (small animal PET) è una metodica di imaging molecolare che permette di superare questi limiti delle vecchie metodiche di imaging in quanto fornisce immagini relative a determinati processi biologici senza la necessità di sacrificare l'animale ed in modo non invasivo. In questo modo è possibile studiare un processo biologico nel contesto fisiologico dell'animale ed in modo longitudinale (lo stesso animale può essere analizzato in più sessioni ripetute), riducendo quindi la variabilità interindividuale dovuta al diverso background genetico che normalmente caratterizza le diverse cavie.

Sebbene i principi di funzionamento siano simili, i tomografi small animal PET rappresentano un'evoluzione rispetto ai tomografi utilizzati nell'uomo in quanto è stato necessario ottenere progressi nel campo ingegneristico per produrre rilevatori abbastanza potenti da fornire immagini ad alta risoluzione che permettano di studiare strutture molto piccole, come ad esempio il cuore di un topo. Per questo motivo questi tomografi sono stati introdotti in commercio solo recentemente e si conoscono ancora poco le loro potenzialità. La ricerca dei processi fisiopatologici alla base delle malattie si basa sempre di più sulla laboriosa creazione di modelli animali preziosi come topi geneticamente modificati. E' presumibile che approcci di indagine come la small animal PET si diffondano sempre più in futuro perché permetteranno di studiare in modo non invasivo questi modelli animali riducendo i tempi ed i costi necessari per ottenere dati definitivi in un protocollo sperimentale.

CAPITOLO 5- MODELLI ANIMALI E METODI UTILIZZATI

5.1 Ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione del metabolismo.

5.1.1 Modelli animali utilizzati

Due diversi modelli murini che presentavano delezione genetica del recettore CB1, sono stati utilizzati per valutare il ruolo tessuto specifico di questo recettore nel controllo dell'omeostasi energetica. Il primo modello utilizzato possiede una delezione totale a livello genomico del gene per il recettore CB1 (*CBI-KO*). La delezione del recettore in questo ceppo murino è stata ottenuta mediante ricombinazione omologa per inserzione della sequenza target come precedentemente descritto (72). Il secondo ceppo murino utilizzato consiste in topi conditional knockout in cui il recettore CB1 è stato deleto esclusivamente in alcune popolazioni cellulari neuronali (*CaMK-CBI-KO*) (73). In questo caso è stato sfruttato il sistema Cre/loxP (Suber 1990), predisponendo l'espressione della ricombinasi CRE (che opera la delezione di CB1) sotto il controllo della sequenza regolatoria (promotore) del gene per la chinasi Ca²⁺/calmodulina-dipendente (*CaMKIIαCre*) cellulo-specifica come precedentemente descritto (73).

Topi maschi sono stati stabulati in gabbie individuali in condizioni di temperatura controllata (+24 °C) e con cicli di illuminazione stabili (12 ore di luce e 12 ore di buio) negli stabulari DIMORFIPA dell'Università di Bologna. Tutte le procedure utilizzate sono state eseguite nel rispetto delle linee guida per l'utilizzo degli animali di laboratorio della comunità europea (86/609/EEC) ed approvate dal comitato centrale veterinario dell'Università di Bologna.

Gli animali sono stati sottoposti a differenti regimi alimentari a partire dalla ottava settimana di vita fino alla ventesima settimana per studiare l'effetto di diete a diversa composizione calorica sul fenotipo. A tale scopo è stata usata una dieta da laboratorio standard (SD) con contenuto energetico di 12.3 KJ/g (11% grassi, 19% proteine, 70% carboidrati; Dr. Piccioni Lab, Gessate, Milano, Italia), una mediamente ipercalorica (HFD) avente 18.9 KJ/g (40% grassi, 15% proteine, 45% carboidrati; Dottor Piccioni Lab, Italia) e una dieta super grassa ad alto contenuto calorico avente 21,3 KJ/g (60,3% grassi, 18,4% proteine, 21,3% carboidrati, TD.06414 Harlan Teklad, Italia).

Prima di essere arruolati nello studio, gli animali sono stati genotipizzati mediante Real time PCR su estratti genomici ottenuti dalla coda come precedentemente descritto (72) (73). Al termine di ogni procedura sperimentale gli animali sono stati sacrificati e la stessa procedura è stata applicata per confermare i diversi genotipi. In tabella 1 sono descritti i primers per CB1 utilizzati durante la genotipizzazione.

5.1.2 Isolamento dell'RNA ed analisi con Real Time PCR

L'espressione del recettore CB1, così come l'espressione di alcuni geni coinvolti nel metabolismo energetico, è stata valutata mediante Real Time PCR su alcuni tessuti centrali e periferici come l'ipotalamo, il midollo spinale, il tessuto adiposo bianco, il tessuto adipo bruno, il pancreas, il fegato, il surrene, l'intestino tenue, le ghiandole surrenali, il soleo. L'RNA tissutale è stato estratto con reagente Trizol (Invitrogen, Cergy, Francia) e trattato con il kit Turbo DNA-free (Ambion, Austin, TX). L'integrità dell'RNA estratto è stata testata attraverso elettroforesi capillare utilizzando il kit 6000 Nano Lab-on-a-Chip e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Un μg di RNA è stato retrotrascritto utilizzando primers esamerici random e la Trascrittasi Inversa Superscript III (Invitrogen, Cergy, Francia). Il cDNA è stato amplificato utilizzando il kit SYBR® Green qPCR (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, Francia). I primers sono stati sintetizzati da Eurogentech (Eurogenetech, Liege, Belgio) (Tabella1). Ogni analisi è stata effettuata in duplicato e una curva standard ottenuta da 10 diluizioni consecutive di cDNA è stata inclusa per ogni analisi. L'espressione relativa del gene è stata corretta per l'efficienza di PCR e normalizzata per il gene housekeeping β -actina.

gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	Gene ID
<i>CB1</i>	GTGCTGTTGCTGTTTCATTGTG	CTTGCCATCTTCTGAGGTGTG	NM_007726
<i>PGC-1α</i>	ACTATGAATCAAGCCACTACAGAC	TTCATCCCTCTTGAGCCTTTTCG	NM_008904
<i>Nrf-1</i>	ACAGATAGTCCTGTCTGGGGAAA	TGGTACATGCTCACAGGGATCT	NM_010938.3
<i>Tfam</i>	AAGACCTCGTTCAGCATATAACATT	TTTTCCAAGCCTCATTTACAAGC	NM_009360
<i>CoxIV</i>	GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG	TTAGCATGGACCATTGGATACGG	NM_053091
<i>Cyt.c</i>	ATAGGGGCATGTCACCTCAAAC	GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG	NM_007808
<i>CCKar</i>	AATGCCTCCGGGTAAGAAGG	TGAGTCCCACATGCTAGTTTTTCCT	NM_009827
<i>UCP-1</i>	AAAAAGAGCTGATGAAGTCCAGACA	TCAGTATCTCTTCCCTCCAAGTTGCT	NM_009463
<i>DBH</i>	ACAAGACTTCTGCTGTCCGCTT	TCTTCCAGCGTGGAGGTGAT	NM_138942
<i>β-actin</i>	TGACCGAGCGTGGCTACA	CATAGCACAGCTTCTCTTTGATGTC	NM_007393

Tabella 1 : primers utilizzati nello studio per analizzare l'espressione dei vari geni.

5.1.3 In situ Real Time PCR

Il ganglio nodoso degli animali è stato espantato come precedentemente descritto (74) e analizzato attraverso in situ Real Time PCR. Attraverso microdissezione laser, sezioni congelate (20 µm) sono state tagliate usando il microtomo CM3050 S (Leica). Le sezioni tissutali sono state montate su vetrini (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germania) e pretrattate per inattivare eventuali RNasi presenti. Le sezioni ottenute sono state poi colorate con una soluzione di crisilvioletto all'1% per 5 secondi. Successivamente le sezioni sono state deidratate attraverso una serie di bagni in etanolo (30s in etanolo al 70% e due volte in etanolo al 100% per un minuto) e lasciate asciugare per 2 minuti. Immediatamente dopo la reidratazione la microdissezione laser è stata effettuata attraverso il sistema PALM MicroBeam versione 4.0-1206 (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG) ad ingrandimento 5X. Dopo l'identificazione del ganglio nodoso l'RNA è stato estratto e l'analisi in Real Time PCR effettuata come sopra descritto. La natura vagale della regione isolata è stata verificata analizzando l'espressione del gene per il recettore della CCKA (74).

5.1.4 Ibridazione in situ

Le procedure di singola e doppia ibridazione in situ sono state effettuate utilizzando ribosonde per il recettore CB1 radioattive e non radioattive insieme a ribosonde non radioattive per marcatori come GLP-1 per le analisi dell'espressione di CB1 in ipotalamo, nel nucleo del tratto solitario e nel ganglio nodoso. Per studiare l'espressione del recettore CB1 nei gangli cervicali simpatici è stato utilizzato il marker dopamina beta idrossilasi (DBH).

Il cDNA di GLP-1 (imaGenes, access number 1164409, Germania) è stato subclonato in un vettore pBluescript utilizzando gli enzimi di restrizione *EcoRI* and *NotI* (150 bp from 669 to 819, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La ribosonda antisenso è stata sintetizzata con RNA polimerasi T3 (Roche, Basel, Svizzera) mentre la ribosonda di senso, con T7 RNA polimerasi (Roche). Il cDNA per DBH è stato preparato (da S. Laaß, Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany; Genbank Acc. No.:NM_138942/S50200) e clonato nel vettore pBluescript, utilizzando gli enzimi di restrizione *PstI* e *EcoO109I* (530 bp from 671 to 1223, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La ribosonda antisenso sintetizzata con T7 RNA polimerasi (Roche, Basel, Switzerland) mentre la ribosonda senso con T3 RNA polimerasi (Roche).

5.1.5 Immunoistochimica ed Immunofluorescenza

La preparazione dei tessuti ipotalamici e di brainstem per l'analisi con immunoistochimica è stata effettuata come precedentemente descritto (75).

Sezioni di 25 µm di ipotalamo e brainstem sono state ottenute grazie ad un microtomo (Leica Microsystems, Vienna, Austria) e la presenza di CB1 è stata valutata utilizzando un anticorpo policlonale di capra (diluizione 1:900) diretto contro i 31 amminoacidi C-terminali (443-473) del recettore CB1 murino (76). Un anticorpo di asino biotinilato diretto contro IgG di capra (diluizione 1:500; Jackson Lab, West Grove, PA) è stato poi usato come anticorpo secondario. La specificità degli anticorpi utilizzati è stata precedentemente valutata in altri lavori (77, 78).

Per studiare l'innervazione adrenergica nel BAT di animali sottoposti a simpatectomia (in modo da verificare l'efficacia della procedura di simpatectomia, vedi dopo), è stato utilizzato un anticorpo policlonale di ratto (diluizione 1:2000, Chemicon-Millipore, Temecula, CA 92590) diretto contro la tirosina idrossilasi ed un anticorpo di asino coniugato con rhodamina diretto contro IgG di coniglio (1:200 Jackson Immuno Research) come anticorpo secondario. I tessuti di BAT da analizzare sono stati collocati in paraformaldeide al 4% per 4 ore e poi trasferiti in una soluzione di sucrosio al 25% in PBS (PBS 0.01 N) per 24h alla temperatura di 4°C. Sezioni tissutali di 5 µm sono state tagliate, messe su vetrino e disposte nel congelatore a -20°C.

I tessuti di ganglio nodoso analizzati sono stati ottenuti come per il BAT, in questo caso è stato utilizzato un anticorpo policlonale di ratto (diluizione 1:300) diretto contro gli ultimi 73 residui aminoacidici del CB1 di ratto (78), quest'ultimo generosamente fornito dal Dr. K. Mackie, Indiana University, Bloomington, USA.

In questo caso è stato anche utilizzato un ulteriore anticorpo per valutare la localizzazione del segnale del CB1 in corrispondenza neuronale. A tale scopo è stato utilizzato un anticorpo policlonale di ratto diretto contro il marker neuronale HuC/D (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA 95060). Anticorpi di asino diretti contro IgG di topo, coniugati con fluorescina isothiocyanato (FITC) e rhodamina (TRICT) (entrambi con diluizione 1:500), sono stati utilizzati come anticorpi secondari e i vetrini dei campioni ottenuti analizzati con microscopio a fluorescenza (Olympus AX70) equipaggiato con doppio filtro per FITC e TRICT.

5.1.6 Western Blotting

Campioni di BAT sono stati omogenizzati tramite un kit di estrazione per proteine (T-PER, Pierce) in presenza di una soluzione 1mM di NaVO₄ con NaF (10Mm) ed un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma Aldrich). Il contenuto totale di proteine è stato determinato attraverso un saggio a base di acido bichinonico (Pierce) e 50 µg di proteine sono state fatte correre su un gel SDS-page in condizioni di riduzione. Le proteine separate sono state poi trasferite per elettroforesi su una membrana di nitrocellulosa (Pierce). Sono stati poi utilizzati anticorpi anti-PGC-1 α (diluizione 1: 1000, Cell Signaling), anti-COX IV (diluizione 1:500, Molecular Probes), and anti-Cyt c (diluizione 1:500, BD Bioscience), anti-UCP-1 (diluizione 1:1000, Calbiochem) ed anti-GAPDH (diluizione 1:20000 Histo-Line Laboratories). L'immunostaining è stato rilevato tramite un' incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi anti IgG di coniglio o topo coniugati con perossidasi. Le bande ottenute sono state poi rilevate attraverso il substrato SuperSignal Substrate (Pierce).

5.1.7 Analisi del comportamento alimentare

Per studiare l'effetto della delezione di CB1 sul comportamento alimentare, la quantità di cibo assunta dagli animali (food intake) è stata monitorata durante le 12 settimane di somministrazione dei vari regimi alimentari attraverso due misurazioni per settimana.

A partire dal calcolo della quantità di cibo ingerita, si è ottenuto il parametro di feed efficiency, definito come la quantità di peso corporeo accumulato durante un intervallo di tempo diviso il contenuto totale di calorie ingerite nello stesso intervallo. In questo modo è stato possibile valutare la capacità degli animali di convertire il contenuto calorico ingerito con la dieta (g/KJ) in unità di peso corporeo.

Alcuni studi sono stati effettuati in condizioni di digiuno ed è stato valutato in questo caso l'effetto della somministrazione del farmaco rimonabant sul food intake. Dopo 24 ore di digiuno gli animali sono stati trattati con rimonabant (3 or 10 mg/kg i.p.) o veicolo (3% DMSO, 1% Tween80 in soluzione salina) e 30 minuti dopo la somministrazione è stato loro fornito un contenuto di cibo prestabilito. Un' ora dopo è stata poi valutata la quantità di cibo consumata dagli animali.

Per studiare il comportamento alimentare nella fase notturna e diurna, ad una parte degli animali è stato fornito un contenuto prestabilito di dieta in corrispondenza dell'inizio del ciclo di luce. Il cibo rimanente è stato pesato alla fine della fase di luce o di buio rispettivamente. Le misurazioni sono state ripetute per 3 giorni e il valore medio di food intake relativo ai 3 giorni di monitoraggio è stato ottenuto per la fase diurna e per la fase notturna.

5.1.8 Misurazione di ormoni e metaboliti.

Al fine di studiare il profilo metabolico plasmatico degli animali, campioni di sangue di circa 1 ml sono stati ottenuti al momento del sacrificio dell'animale, attraverso un prelievo sotto anestesia gassosa con sevofluorano di circa 1 ml di sangue dalla vena cava inferiore.

I livelli plasmatici di leptina sono stati valutati attraverso il kit RIA per topo ML-82k (Millipore Corporation), l'insulina attraverso il kit RIA per ratto kit RI-13K (Millipore Corporation), il contenuto di FFA attraverso un metodo colorimetrico (Wako Chemicals, Richmond, VA), i livelli di trigliceridi e colesterolo totale attraverso un test enzimatico spettrofotometrico (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e il glucosio attraverso un glucometro (Breeze, Bayer). Per studiare il contenuto di catecolamine plasmatiche, dei cateteri intracardiaci sono stati collocati negli animali e circa 600 µl di sangue sono stati prelevati ad animale sveglio. Le catecolamine plasmatiche sono state calcolate attraverso cromatografia liquida secondo il metodo precedentemente descritto (79).

Per studiare il contenuto di lipidi epatici ed ottenere informazioni sulla steatosi epatica i lipidi epatici sono stati estratti in cloroformio/metanolo (rapporto di 2:1 con 0,01% BHT) e quantificati attraverso il kit BV-K622-100 (BoVision, Mountain View, CA, USA).

5.1.9 Quantificazione del tessuto adiposo con microCT

Il tomografo microCT eXplore Locus (GE, Milwaukee, USA) è stato utilizzato per ottenere immagini relative all'intera anatomia dell'animale ad una risoluzione isometrica di 90 µm. Durante la procedura di scansione (durata 18 minuti) i topi sono stati addormentati tramite anestesia gassosa con sevofluorano (5% sevofluorano e 1L/min di ossigeno).

Le immagini microCT sono state ricostruite utilizzando la procedura di filtered back-projection e calibrate in unità Hounsfield. Il volume di interesse utilizzato per quantificare il grasso includeva la regione anatomica compresa tra la vertebra T1 e la vertebra L4 (pressappoco tutto il

corpo dell'animale). Un valore di soglia (Threshold) ottenuto da una precedente scansione effettuata su un deposito di grasso espantato da un animale, è stato applicato sull'immagine per ottenere il volume di tessuto adiposo contenuto nell'animale attraverso il software eXplore Microview v 2.0, GE. L'aria contenuta all'interno della cavità toracica e nell'apparato gastrointestinale è stata manualmente esclusa dalle immagini in quanto è stato notato come questa può interferire nella quantificazione del grasso, utilizzando il valore di Threshold trovato in questo studio. Il volume di tessuto adiposo (mm³) ottenuto è stato convertito in grammi di tessuto utilizzando il fattore di densità per il grasso indicato nel database N.I.S.T (<http://www.nist.gov>).

5.1.10 Analisi della spesa energetica e della temperatura corporea

Gli animali sono stati collocati individualmente all'interno di gabbie metaboliche climatizzate Makrolon di tipo II con un flusso d'aria di 45 l/h. Il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ vengono misurati ogni ora attraverso un analizzatore per O₂ ad un canale (S3AII®, Ametek, Sunnyvale USA), ed un analizzatore a CO₂ con doppio canale (UNOR 6N®, Maihak AG, Hamburg, Germany), entrambi con una risoluzione di 0.001 Δ Vol%. I Campioni di aria ottenuti dalla camera vengono confrontati con dei campioni di aria di riferimento; il rate metabolico è stato calcolato secondo l'equazione $VO_2 \text{ [ml O}_2 \text{ h}^{-1}] = \Delta \text{ Vol\% O}_2 \times \text{Flusso [l/h]} \times 10$ e normalizzato per il peso corporeo, mentre il quoziente respiratorio (RQ) come il volume di CO₂ prodotto per il volume di O₂ consumato.

Una parte degli animali è stata analizzata in condizioni basali, altri gruppi invece sono stati studiati all'interno delle gabbie metaboliche dopo somministrazione di rimonabant, oppure dopo esposizione a freddo in modo da valutare la spesa energetica in condizioni di stimolazione della termogenesi. Nel primo caso gli animali sono stati posizionati all'interno delle gabbie metaboliche nel giorno 1 e sono stati trattati con rimonabant (10 mg/kg i.p.) all'inizio della fase di luce al giorno 2.

Per quanto riguarda gli esperimenti in condizioni di esposizione al freddo invece, gli animali sono stati posizionati all'interno della camera e dopo un periodo di condizionamento (3 ore a +24 °C) la temperatura della camera è stata impostata a +6°C. In corrispondenza degli esperimenti con stimolo termogenetico inoltre, la temperatura corporea degli animali è stata valutata utilizzando dei trasmettitori di temperatura (Mini-Mitter®, Model X, Sunriver, Oregon,

accuratezza di 0.1°C) impiantati nel peritoneo. Il segnale di temperatura è stato rilevato da un ricevitore radio e processato attraverso un sistema computerizzato.

Per valutare eventuali modificazioni della capacità di accumulare o liberare energia attraverso le feci, il contenuto energetico delle feci degli animali è stato valutato mediante il metodo della 'bomb calorimetry' attraverso il calorimetro IKA-Calorimeter C 5000 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania).

5.1.11 Analisi del DNA mitocondriale e dell'attività della citrato sintasi

I mitocondri sono stati isolati dal BAT e studiati come precedentemente descritto (80, 81). Un'aliquota del loro DNA mitocondriale è stata estratta e caricata su di un gel di agarosio (1.2%) con etidio bromuro e quantificata mediante densitometro (QuickImage, Packard). Per determinare i livelli di DNA mitocondriale, l'intensità del segnale della banda è stata normalizzata per il contenuto totale di proteine nel tessuto.

Per studiare l'attività dell'enzima citrato sintasi (CS), ad un omogenato di BAT è stato aggiunto un buffer contenente 0.1 mmol/l di acido 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoico), 0.5 mmol/l di ossalacetato, 50 µmol/l EDTA, 0.31 mmol/l acetyl CoA, 5 mmol/l trietanolamina idrocloride, e 0.1 mol/l di Tris-HCl, pH 8.1. L'attività della CS è stata espressa come nanomoli di citrato prodotte per minuto per mg di proteine (82).

5.1.12 Studi con Small Animal PET/CT

Terminate le 12 settimane di regime alimentare specifico gli animali sono stati analizzati tramite small animal PET e CT imaging per valutare la funzionalità termogenetica del BAT attraverso il tracciante PET ^{18}F -FDG. Per studiare invece la funzionalità simpatica periferica nel tessuto, è stato utilizzato il tracciante sperimentale ^{11}C -meta-idrossiefedrina (^{11}C -HED), un analogo radioattivo della noradrenalina.

Per gli studi con ^{18}F -FDG, gli animali sono stati analizzati attraverso due diverse sessioni sperimentali. In una prima sessione gli animali vengono messi a digiuno per 8 ore e mantenuti all'interno di un locale termoregolato alla temperatura di 24°C.

Terminate le 8 ore di digiuno gli animali vengono iniettati per via intraperitoneale con una soluzione veicolo (3% DMSO in soluzione all'1% di Tween80) e, 1 ora dopo, collocati in una camera fredda (6°C) per 3 ore. Successivamente gli animali vengono leggermente anestetizzati

(gas sevofluorano) in modo da effettuare l'iniezione del tracciante (15 MBq di ^{18}F -FDG) nella vena della coda. Immediatamente dopo l'iniezione del tracciante, gli animali vengono svegliati e posizionati nella camera fredda per 1 ora (fase di uptake del tracciante nei vari tessuti). Al termine della fase di uptake, si procede poi con la scansione tramite il sistema PET Explore Vista (GE) (durata 15 minuti) seguita da una scansione microCT con il sistema Explore Locus (GE) (durata 5 minuti). La procedura di scansione consiste nel posizionamento dell'animale su di un lettino di scansione che viene poi collocato all'interno della macchina. In corrispondenza di questo lettino, vengono posizionate manualmente delle biglie radioopache (visibili attraverso la microCT) imbevute in una soluzione di ^{18}F -FDG, in modo da poter essere rilevate attraverso la PET. Terminata la scansione PET, il lettino contenente l'animale (tenuto in condizioni di anestesia) e le biglie, viene spostato e collocato all'interno della microCT. Durante questa procedura, bisogna evitare di produrre spostamenti del corpo dell'animale rispetto al lettino di scansione, poichè le biglie collocate sul lettino vengono utilizzate come riferimenti anatomici per sovrapporre nello spazio le immagini PET e TAC, separatamente ottenute dai due strumenti tramite una procedura via software.

La stessa procedura è stata poi ripetuta dopo 5 giorni di stabilizzazione negli stessi animali iniettando però in questo caso Rimonabant (10 mg/kg i.p. disciolto in DMSO e tween 80) al posto della soluzione veicolo. Lo stesso set di esperimenti inoltre è stato ripetuto in animali sottoposti a simpatectomia chimica o chirurgica del BAT (vedi sezione successiva). Per gli studi con ^{11}C – HED, gli animali sono stati analizzati iniettando 20 MBq di tracciante nella vena caudale e la scansione azionata immediatamente dopo l'iniezione del tracciante. In uno studio precedente è stato descritto come l'analisi della captazione tissutale di questo tracciante in organi come il BAT, rappresenti una effettiva stima della attività funzionale noradrenergica nel tessuto (83).

Due sessioni di imaging sono state effettuate, la prima in animali analizzati a temperatura ambiente (+ 24°C), la seconda ripetuta sugli stessi animali con esposizione al freddo come sopra descritto. Ottenute le immagini di scansione PET e TAC, queste sono state sovrapposte con una procedura via software per ottenere immagini di fusione, in modo da poter verificare la correttezza della zona anatomica analizzata attraverso le immagini PET.

L'analisi della captazione tissutale del tracciante nel BAT, è stata effettuata utilizzando il parametro SUV, espresso come attività radioattiva calcolata sull'immagine per grammo di tessuto, diviso per la dose radioattiva iniettata e per il peso corporeo in grammi dell'animale.

5.1.13 Procedure di simpatectomia

Al fine di studiare il ruolo svolto dal SNS nel regolare il fenotipo degli animali, sono state utilizzate due diverse procedure di eliminazione funzionale dell'attività nervosa simpatica (simpatectomia). Una prima procedura ha previsto l'iniezione giornaliera per 3 giorni consecutivi di 80 mg/kg del farmaco 6-idrossi-dopamina (6-OH-DA) diluito in 0.1% di acido ascorbico. Questa procedura garantisce una regressione della funzionalità dei terminali simpatici periferici per la durata di 10 giorni (84, 85). Una parte degli animali è stata invece sottoposta ad una procedura di simpatectomia chirurgica del BAT. In questo caso le terminazioni simpatiche che innervano il BAT soprascapolare sono state esposte ed eliminate per via chirurgica. Alcuni animali sono stati utilizzati come controllo chirurgico, in questo caso le terminazioni simpatiche sono state esposte ma non tagliate.

Il dolore e l'infiammazione post intervento sono stati controllati attraverso iniezioni sottocutanee giornaliere di carprofen (2mg/kg) per i 3 giorni consecutivi all'intervento.

Al termine delle procedure sperimentali, l'effettiva riuscita della simpatectomia è stata verificata per entrambi gli approcci (chirurgico e chimico), valutando con immunistochemica (come precedentemente descritto) l'immunoreattività della tirosina idrossilasi in campioni *ex vivo* di BAT.

5.1.13 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism version 5.0 attraverso test di Student non appaiato o analisi della varianza (ANOVA) con appropriato post-hoc test. Valori di p minori di 0.05 sono stati considerati come soglia di significatività.

5.2 Tessuto adiposo bruno e controllo della sensibilità insulinica

5.2.1 Modelli animali utilizzati

Topi maschi BL6-JN sono stati alimentati con i diversi regimi alimentari e nelle stesse modalità descritte nel paragrafo precedente. Al termine del periodo di somministrazione della dieta, il BAT degli animali è stato studiato attraverso PET imaging, al fine di studiare il ruolo dell'insulina nel regolare il funzionamento di questo tessuto in condizioni di obesità indotta da

dieta. Tutte le procedure utilizzate sono state eseguite nel rispetto delle linee guida per l'utilizzo degli animali di laboratorio della comunità europea (86/609/EEC) e approvate dal comitato centrale veterinario dell'Università di Bologna.

5.2.2 Studi con Small Animal PET/CT in assenza di bilanciamento glicemico

Per studiare la capacità dell'insulina di regolare l'uptake del glucosio nel BAT, gli animali sono stati studiati attraverso 2 scansioni ripetute PET/CT utilizzando il tracciante ^{18}F -FDG. In una prima sessione è stato studiato l'uptake basale di ^{18}F -FDG nei 3 gruppi di animali (SD, HFD e SHFD). Sei giorni dopo la prima scansione, gli animali sono stati rianalizzati in condizioni di trattamento con insulina, e l'uptake di ^{18}F -FDG nel BAT ottenuto (con analisi SUV, come precedentemente indicato) è stato confrontato con il valore di uptake tissutale basale. Gli animali sono stati studiati dopo 5 ore di digiuno in un locale termoregolato (+24 °C).

Il tracciante (15 MBq di ^{18}F -FDG) è stato iniettato nella vena della coda (t0') e immediatamente dopo la somministrazione, una soluzione di veicolo (per la prima sessione di imaging) o di insulina (Acta rapid, Novo Nordisk) alla concentrazione di 0,7 U/kg (per la seconda sessione sperimentale) è stata iniettata per via intraperitoneale. Un'ora dopo i trattamenti (t60', fase di uptake del tracciante), la scansione PET/CT è stata effettuata secondo le modalità precedentemente descritte. Campioni di sangue in duplicato sono stati inoltre ottenuti dalla vena della coda degli animali negli istanti t0' e t60', per studiare la concentrazione di glucosio ematico [mg/dl] degli animali attraverso un glucometro (Breeze glucometer, Bayer).

5.2.3 Studi con Small Animal PET/CT in condizioni di euglicemia

Una seconda corte di animali è stata studiata valutando l'uptake di ^{18}F -FDG nel BAT, in seguito a trattamento con insulina in una condizione di mantenimento costante dei livelli di glucosio ematico. L'insulina infatti determina una riduzione del contenuto plasmatico di glucosio, che può innescare risposte fisiologiche controregolatorie producendo ormoni che potrebbero avere un'influenza sul consumo di glucosio nel BAT. Per analizzare questo fenomeno, un catetere venoso è stato collocato per via chirurgica nella vena giugulare destra degli animali (86). Dopo il recupero dall'intervento, sono state effettuate due sessioni sperimentali con una procedura simile

a quanto precedentemente descritto. In questo è stata inizialmente effettuata una sessione sperimentale in cui, successivamente all'iniezione di insulina e ^{18}F -FDG (come precedentemente descritto), il glucosio ematico è stato mantenuto costante per 1 ora attraverso un'infusione variabile di glucosio esterno al 10% mediante una pompa peristaltica (PY8 70-2217, Harvard apparatus). La concentrazione di glucosio ematico è stata monitorata prelevando dei campioni di sangue dalla coda ogni 5 minuti ed analizzandoli con glucometro. In questo modo è stato possibile regolare in modo variabile il flusso di infusione di glucosio esterno al fine di mantenere la condizione di euglicemia.

La seconda sessione sperimentale è stata effettuata iniettando ^{18}F -FDG e veicolo, e sottoponendo l'animale alle stesse condizioni sperimentali dello scan precedente. In questo caso inoltre, per escludere un eventuale fonte di errore dato dall'effetto della diluizione plasmatica del sangue sulla disponibilità del tracciante, è stata infusa una soluzione fisiologica di controllo attraverso il catetere venoso con lo stesso flusso medio utilizzato nella sessione precedente.

5.2.4 Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism version 5.0 attraverso analisi 2 way ANOVA ripetuta con post test appropriato. Valori di p minori di 0.05 sono stati considerati come soglia di significatività.

CAPITOLO 6- Risultati e conclusioni: Il sistema endocannabinoide e l'obesità.

6.1 Caratterizzazione anatomica dell'espressione del recettore CB1 nei modelli animali utilizzati

I topi conditional knockout per il recettore CB1 utilizzati in questo studio (CaMK-CB1-KO), sono stati ottenuti utilizzando il sistema di ricombinazione Cre/loxP, attraverso l'incrocio tra topi mutanti CB1^{flox/flox} con topi transgenici in grado di esprimere la ricombinasi CRE in alcune popolazioni neuronali (87; 72). In questo modello animale la ricombinasi CRE viene espressa nella maggior parte dei neuroni adulti del forebrain (ad esclusione degli interneuroni GABAergici) e nell'ipotalamo (87). Esclusivamente in queste popolazioni cellulari avviene quindi la ricombinazione del recettore CB1 e la sua conseguente delezione. Al fine di ottenere un'accurata caratterizzazione dell'espressione del recettore nelle varie sedi anatomiche, questo modello animale è stato ulteriormente fenotipizzato in questo lavoro di tesi.

Come atteso, l'abbondante espressione di CB1 nei neuroni ipotalamici, sia in termini di mRNA che di livelli proteici, risulta essere assente nel topo CaMK-CB1-KO. L'analisi con ibridazione in situ e immunostochimica rivela infatti una completa assenza dell'espressione del recettore nei topi CaMK-CB1-KO rispetto ai topi wild type (WT) nell'ipotalamo (figure 3A e 3B). Il nucleo del tratto solitario (NTS) è uno dei siti cerebrali maggiormente coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico (88). Questa regione del cervello riceve input da regioni cerebrali superiori (come l'ipotalamo e la corteccia cerebrale), ma anche da segnali periferici vagali (attraverso il ganglio nodoso). In risposta a questi input, questo centro cerebrale regola poi segnali che controllano la funzione di diversi organi periferici coinvolti nel controllo del metabolismo energetico (88). E' noto in letteratura che il recettore CB1 viene espresso in neuroni afferenti (che afferiscono al cervello) ed efferenti (diretti verso la periferia) l'NTS (89). L'analisi con doppia ibridizzazione in situ effettuata utilizzando GLP-1 (un marker per individuare i neuroni dell'NTS), dimostra che negli animali CaMK-CB1-KO l'espressione dell' mRNA viene preservata nell'NTS (figura 3C). La proteina CB1 tuttavia non viene prodotta nell'NTS di questi animali (figura 3C). Considerando che la proteina CB1 viene espressa principalmente a livello presinaptico, la preservata espressione dell'mRNA di CB1 suggerirebbe che la proteina può essere prodotta nei terminali assonici delle fibre efferenti l'NTS in questi animali.

Il ganglio nodoso è una struttura nervosa che controlla l'omeostasi energetica processando segnali vagali, originati dall'apparato gastrointestinale a livello di centri nervosi superiori (come l'NTS). L'espressione dell'mRNA per il recettore CB1 non risulta modificata nella porzione rostrale e distale del ganglio nodoso dei topi conditional knockout (figure 3D, 3G). Anche l'immunoreattività di CB1 non risulta modificata (figura 3H). Quindi nel complesso, il signaling CB1 dipendente nei neuroni vagali afferenti l'NTS e nel ganglio nodoso, non risulta in alcun modo affetto dalla delezione operata dalla ricombinasi CRE nel topo conditional knockout.

Per studiare l'espressione del recettore nei gangli nervosi di natura simpatica, l'espressione dell'mRNA di CB1 è stata valutata insieme all'espressione del marker dopamina- β -idrossilasi (DBH), nei gangli nervosi simpatici cervicali degli animali. Come dimostrato dall'analisi di ibridazione in situ, l'espressione dell'mRNA di CB1 è significativamente ridotta nei gangli simpatici degli animali knockout (figura 3E). Quindi, parte della componente periferica neuronale (la componente simpatica), risulta essere affetta dalla delezione di CB1 nei topi conditional knockout.

La valutazione dell'espressione di CB1 in organi non neuronali attraverso Real time PCR, rivela invece che sedi periferiche non neuronali coinvolte nella regolazione del metabolismo energetico, non sono affette dalla delezione di CB1 in questi topi. L'espressione dell'mRNA di CB1 nel tessuto adiposo bianco, nel BAT, nel fegato, intestino, surrene, midollo spinale e nel muscolo soleo dei topi CaMK-CB1-KO, risulta infatti comparabile a quella dei rispettivi topi WT (figura 3F). In conclusione, i topi conditional knockout per CB1 utilizzati in questo studio, sono caratterizzati da una delezione del recettore CB1 nei neuroni dell'ipotalamo e del forebrain e da un ridotto signaling di CB1 nei gangli nervosi simpatici periferici. Il signaling CB1 dipendente rimane invece, in questi topi, intatto a livello non-neuronale (la figura 4 riassume la distribuzione del recettore in questo modello animale). L'analisi dell'espressione del recettore in tessuti neuronali e non neuronali di topi total knockout (CB1-KO), rivela invece come atteso, che il recettore CB1 viene deletato a livello globale in questo secondo modello murino (figura 3F).

6.2 Valutazione del fenotipo degli animali alimentati con dieta standard

L'analisi delle curve di peso in condizioni alimentari standard, rivela che i topi conditional knockout (CaMK-CB1-KO) presentano un peso ridotto rispetto ai topi WT (figura 5A). Il

fenotipo magro dei topi conditional knockout tuttavia, risulta essere meno pronunciato rispetto al fenotipo di topi con delezione totale di CB1 (*CBI-KO*) (figura 5B e 5C). La mancanza di CB1 in neuroni del forebrain e simpatico, non spiega quindi in modo completo la riduzione di peso osservata nei topi con delezione totale del recettore CB1 in SD. E' noto come l'antagonismo del recettore CB1 induca profondi effetti sul food intake, sul peso corporeo e sull'ossidazione lipidica (90). Per analizzare il ruolo svolto dal recettore CB1 neuronale nel mediare questi effetti, topi *CaMK-CBI-KO* e rispettivi WT, sono stati analizzati dopo trattamento acuto con rimonabant (3mg/kg). Come mostrato in figura 5D e 5E, la somministrazione di rimonabant riduce il peso corporeo e il quoziente respiratorio (RQ) nei topi WT, ma non produce nessun effetto in topi *CaMK-CBI-KO*. Il rimonabant ha un'azione particolarmente efficace nel controllare il food intake dopo una condizione di digiuno prolungato (25). Alla luce di questa evidenza, gli animali sono stati studiati in condizioni di digiuno per 24 ore e poi trattati con il farmaco con le stesse modalità sopra indicate.

Come indicato in figura 5F, dopo 24 h di digiuno gli animali *CaMK-CBI-KO* mangiano meno rispetto ai controlli ed il trattamento con rimonabant riduce in modo statisticamente significativo il food intake solo negli animali WT ma non nei topi *CaMK-CBI-KO*.

Nel loro complesso quindi, questi dati indicano che il recettore CB1 espresso in neuroni del forebrain e simpatico, è un importante mediatore degli effetti acuti del rimonabant sul comportamento alimentare, sul peso corporeo e sulla ossidazione lipidica.

6.3 Valutazione del fenotipo degli animali alimentati con dieta ipercalorica

Al fine di valutare il ruolo del recettore CB1 neuronale in condizioni di obesità indotta da dieta (diet-induced obesity, DIO), i topi conditional knockout ed i topi con delezione globale di CB1 sono stati studiati (insieme ai rispettivi controlli) in seguito alla somministrazione di dieta grassa a medio contenuto calorico (HFD, 40% kcal derivate da grasso) per 12 settimane. Prima di studiare il fenotipo degli animali in condizione di DIO, si è deciso di analizzare se la somministrazione della dieta grassa potesse influenzare l'espressione del recettore CB1 nei topi conditional knockout. A tal fine, i livelli di mRNA per CB1 sono stati studiati in topi alimentati con HFD e con SD (dieta standard) in alcuni tessuti periferici come il WAT, il BAT e il fegato in animali WT in dieta standard e dieta grassa.

Come indicato in figura 6, l'espressione dell'mRNA di CB1 (analizzata con Real Time PCR) aumenta dopo somministrazione di dieta grassa nel fegato e nel BAT degli animali WT. Questo aumento rimane statisticamente significativo nel fegato ma non nel BAT degli animali CaMK-CB1-KO. Nessuna modificazione indotta dalla dieta si registra invece nel tessuto adiposo bianco degli animali WT, neppure nei topi conditional knockout. I topi conditional knockout quindi rispondono diversamente alla dieta grassa in termini di espressione di CB1 nel BAT, indicando come questo tessuto sia probabilmente coinvolto nel fenotipo degli animali in condizioni di alimentazione ipercalorica.

Analizzando le curve di peso di animali con delezione condizionale di CB1 e di animali con delezione totale, si può notare come entrambi i modelli murini esibiscano una resistenza all'accumulo di peso in seguito alla somministrazione della dieta; il loro peso corporeo infatti è significativamente inferiore rispetto al peso dei rispettivi animali di controllo (Figure 7A e 7B). Tuttavia, analizzando la percentuale di cambiamento di peso corporeo indotto dalla dieta (il peso percentuale guadagnato al termine della dieta rispetto al peso iniziale), si nota come nei topi conditional knockout, il guadagno di peso indotto dalla dieta sia minore rispetto non solo ai topi di controllo, ma anche rispetto ai topi con delezione totale del recettore CB1 (figura 7C). Inoltre, un trattamento giornaliero cronico con rimonabant (10 mg/kg, i.p per 32 giorni), non induce nessun cambiamento di peso negli animali CaMK-CB1-KO, mentre risulta effettivo nel ridurre il peso corporeo negli animali CaMK-CB1-WT (figura 7D). Nel loro insieme, queste due osservazioni indicano come il recettore CB1 neuronale rappresenti un fattore importante nel controllare il peso corporeo in modo particolare in condizione di DIO.

Per confermare questa evidenza e per studiare il fenotipo degli animali in una condizione di obesità severa, il peso corporeo dei topi conditional knockout è stato monitorato somministrando loro una dieta grassa a maggiore contenuto calorico (dieta superHFD). Come mostrato in figura 7E e 7F, questa dieta comporta un maggiore livello di obesità (in termini di peso corporeo) rispetto alla dieta grassa HFD se somministrata in animali WT, mentre i topi CaMK-CB1-KO mostrano resistenza all'accumulo di peso anche in questa condizione, confermando così l'importanza del recettore CB1 neuronale nel controllo del peso corporeo anche in condizione di obesità severa.

Per analizzare il ruolo svolto dal sistema endocannabinoide nel controllare massa grassa e disregolazioni metaboliche indotte dalla dieta grassa, il contenuto di tessuto adiposo totale

(calcolato con microCT), la steatosi epatica (analizzata attraverso la misura del contenuto epatico di trigliceridi) e il profilo metabolico plasmatico, sono stati calcolati in topi CaMK-*CBI*-KO, *CBI*-KO e rispettivi topi WT al termine dei 3 mesi di somministrazione della HFD.

Per tutti questi parametri non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi di animali WT, per questo motivo i valori ottenuti nei due gruppi sono stati cumulati in modo da migliorare la leggibilità dei risultati.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la dieta grassa utilizzata produce un aumento del contenuto totale di tessuto adiposo in animali WT (se confrontati con la condizione di dieta standard), ma non comporta nessun aumento di massa grassa in entrambi gli animali CaMK-*CBI*-KO e *CBI*-KO (Figure 8A e 8B). Inoltre, è interessante notare come il contenuto totale di grasso sia del tutto simile nei due diversi modelli murini knockout (Figure 8A e 8B). La dieta grassa induce anche un aumento del contenuto totale di trigliceridi nel fegato (indice di steatosi epatica) in animali WT, mentre entrambi i topi knockout risultano protetti da questa disregolazione (figura 8C). Infine, come indicato in figura 8D, la somministrazione di HFD comporta un innalzamento patologico dei livelli plasmatici di leptina, insulina, glucosio, acidi grassi liberi (FFA) e trigliceridi esclusivamente in topi WT mentre i topi knockout risultano protetti da queste alterazioni plasmatiche. Il contenuto totale di colesterolo nel plasma è maggiore in topi WT alimentati in HFD rispetto a topi WT in dieta standard, e i topi knockout presentano dei livelli medi plasmatici minori rispetto ai topi WT, ma in assenza di alcuna significatività statistica.

Nel complesso i risultati ottenuti in figura 6 dimostrano che il recettore CB1 espresso in neuroni del forebrain e simpatici ha un ruolo fondamentale nel controllo non solo del peso corporeo, ma anche delle disregolazioni metaboliche indotte dalla dieta grassa.

6.4 Analisi dell'omeostasi energetica degli animali

Il fenotipo magro osservato in condizione di HFD nei topi CaMK-*CBI*-KO e nei topi *CBI*-KO non è dovuto ad un diverso comportamento alimentare degli animali in quanto il food intake dei topi knockout (la quantità di cibo assunta durante il periodo di monitoraggio del peso) è comparabile a quello dei rispettivi topi WT (figura 9A e 9B).

I topi conditional knockout, tuttavia, presentano una ridotta feed efficiency (figura 9C) rispetto non solo ai topi WT ma anche ai topi *CBI-KO*. In questi animali quindi, una quota minore di energia assunta con la dieta grassa viene convertita in grammi di peso corporeo.

Per analizzare i meccanismi alla base di questa caratteristica dei topi conditional knockout, è stato dapprima studiato il contenuto di energia nelle feci attraverso analisi con bomba calorimetrica.

Come indicato in figura 9D, i topi *CaMK-CBI-KO* sono caratterizzati da una ridotta efficienza di assorbimento di energia attraverso le feci, il contenuto di energia delle loro feci infatti è maggiore rispetto all'energia contenuta nelle feci degli animali WT. La spesa energetica totale dei topi *CaMK-CBI-KO* risulta comparabile a quella degli animali WT (figura 9E), ma il quoziente respiratorio (RQ) risulta essere significativamente ridotto nei topi knockout durante la fase notturna, cioè' durante la fase in cui i topi assumono il cibo (figura 9F).

I topi conditional knockout quindi posseggono una maggiore capacità di ossidare il contenuto lipidico della dieta.

In modo simile a quanto precedentemente descritto per gli animali in dieta standard, iniettando in modo acuto rimonabant (10 mg/i.p.), si ottiene una significativa riduzione dell'RQ in topi WT, ma nessuna modificazione di questo parametro in animali *CaMK-CBI-KO* (figura 9G).

Il recettore CB1 neuronale, quindi, ha un importante ruolo di controllo della capacità di immagazzinare l'energia assunta con la dieta, influenzando l'ossidazione dei lipidi in essa contenuti e l'espulsione attraverso le feci dell'energia assunta.

6.5 Valutazione della termogenesi e della funzionalità del BAT.

Parallelamente alle modificazioni del metabolismo energetico sopra descritte, un aumentato potenziale termogenico potrebbe spiegare la ridotta feed efficiency nei topi *CaMK-CBI-KO*. Il BAT dei topi conditional knockout infatti, risulta avere aumentati livelli di espressione dell'mRNA di alcuni marker di attività mitocondriale e termogenetica come: uncoupling protein 1 (UCP-1), peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), mitochondrial transcription factor A (Tfam), (un gene importante coinvolto nella neogenesi mitocondriale) cytochrome c (Cyt c) e cytochrome c oxidase IV (COX

IV) (due proteine mitocondriali coinvolte nella fosforilazione ossidativa) (figura 10A). Inoltre, il contenuto totale di DNA mitocondriale e l'attività funzionale della citrato sintasi (biomarcatori di contenuto e funzione mitocondriale) risultano significativamente aumentati nel BAT di topi CaMK-CB1-KO rispetto ai topi WT (figura 10A). In accordo con questi risultati ottenuti, l'analisi Western Blot conferma un aumentato contenuto delle proteine PGC-1 α , COX IV e Cyt c nel BAT dei topi CaMK-CB1-KO (figura 10B). Un'aumentata funzionalità mitocondriale quindi, potrebbe essere alla base di una aumentata attività termogenica del BAT e determinare la ridotta feed efficiency e la conseguente resistenza all'obesità indotta dalla dieta nei topi CaMK-CB1-KO. Al fine di valutare questa ipotesi, si è deciso di analizzare la proprietà termogenica degli animali esponendoli ad uno stimolo termogenico.

Gli animali sono stati studiati in condizioni di esposizione acuta a ridotte temperature ambientali (+6 °C) e la funzionalità del BAT, la spesa energetica e la temperatura corporea sono state studiate in questa condizione. Come indicato nelle figure 10C e 10D, la temperatura corporea e la spesa energetica (consumo di ossigeno) sono significativamente maggiori negli animali knockout rispetto agli animali WT durante lo stimolo termogenico. Inoltre, l'analisi *in vivo* della funzionalità del BAT con small animal PET/CT imaging rivela che l'uptake del tracciante ¹⁸F-FDG (analizzato con il parametro SUV) è fortemente aumentato nei topi conditional knockout rispetto ai topi di controllo (Figure 10E e 10F). Questi dati quindi suggeriscono che l'attivazione del recettore CB1 neuronale ha un ruolo importante nel controllare la funzionalità del BAT e conseguentemente la capacità di modificare la termogenesi e la spesa energetica totale.

6.6 Dimostrazione del ruolo svolto dal SNS nel determinare il fenotipo degli animali.

Alla luce delle modificazioni nella funzionalità termogenica e del BAT osservate durante la condizione di DIO, si è deciso di valutare il ruolo svolto dal SNS nel determinare le modificazioni dell'omeostasi energetica nei topi CaMK-CB1-KO. I topi conditional knockout presentano un evidente aumento dei livelli plasmatici di noradrenalina (NE) rispetto ai topi WT, e lo stesso risultato è stato ottenuto per i topi con delezione globale del recettore (figura 11A). Un'aumentata attività del SNS periferico potrebbe essere alla base dell'aumentata funzionalità del BAT nei topi knockout per il CB1. Per verificare questa ipotesi, la metodologia PET in associazione al tracciante ¹¹C-HED (un analogo radioattivo della noradrenalina) è stata utilizzata

al fine di studiare, *in vivo*, l'attività noradrenergica funzionale a livello del BAT nei vari modelli animali. Un aumento della captazione di ^{11}C -HED è stato registrato nel BAT di topi CaMK-CB1-KO e topi CB1-KO rispetto ai topi WT (figura 11B) analizzati a temperatura ambiente (+24 °C), e anche in animali WT trattati in modo cronico con rimonabant (10mg/kg i.p al giorno per 32 giorni) (figura 11C).

Inoltre, esponendo gli animali a stimolo termogenico (+6 °C), questa differenza esistente tra animali knockout ed animali WT diventa più marcata (figura 11B). Un'aumentata attività noradrenergica caratterizza quindi il BAT di animali knockout per il recettore CB1 o di animali trattati con farmaci CB1 antagonisti, e questa proprietà sembra essere alla base della aumentata attività termogenica del tessuto. Per confermare questa possibilità, la funzionalità termogenica e mitocondriale del BAT è stata ri-analizzata in animali sottoposti a procedure di riduzione funzionale del SNS periferico. Gli animali sono stati simpatectomizzati ed analizzati con PET imaging in presenza di stimolo termogenico (+6 °C), al termine della procedure PET il loro BAT è stato espantato e i marker di funzionalità mitocondriale e termogenica analizzati *ex-vivo* con Real Time PCR. L'analisi *in vivo* dell'uptake di ^{18}F -FDG con PET imaging dimostra che entrambe le procedure di simpatectomia chirurgica e chimica aboliscono l'aumentata funzionalità termogenica del BAT dei topi CaMK-CB1-KO (figura 10F). Questa analisi risulta perfettamente in accordo con la valutazione *ex-vivo* dell'espressione dei marker UCP-1, PGC-1 α , NRF-1, Tfam, COX IV, Cyt c (marker di funzionalità termogenica e mitocondriale) che dimostra che l'attivazione mitocondriale e termogenica del BAT di topi CaMK-CB1-KO scompare in seguito a simpatectomia chimica (figura 11D). L'analisi della immunoreattività per la tirosina idrossilasi nel BAT degli animali sottoposti a simpatectomia, conferma l'efficacia della procedura di simpatectomia e l'avvenuta delezione delle fibre nervose simpatiche in corrispondenza del tessuto (figura 11E).

Questi dati quindi confermano che l'attivazione del SNS periferico è un meccanismo importante che determina parte delle modificazioni dell'omeostasi energetica responsabili del fenotipo magro nei topi conditional knockout.

Nel loro insieme questi risultati dimostrano inoltre che il blocco del recettore CB1 induce un'iperattivazione simpatica periferica che a sua volta determina una iperfunzionalità nel BAT, e che il recettore CB1 espresso nei neuroni del forebrain e simpatici ha un ruolo importante nel controllare questo processo metabolico.

6.7 CONCLUSIONI

L'insieme dei dati presentati in questo primo obiettivo del progetto di dottorato, dimostrano nel complesso che il recettore CB1 espresso in alcune popolazioni neuronali, neuroni del forebrain e neuroni simpatico, ha un ruolo chiave nel controllare il bilancio energetico e di conseguenza il peso corporeo, soprattutto in condizioni di alimentazione ipercalorica. I dati presentati a supporto di questa conclusione sono molteplici; la prima evidenza è rappresentata dal fatto che la somministrazione sistemica del farmaco CB1 antagonista rimonabant (un antagonista generale, che agisce quindi sia a livello dei neuroni che nei siti non neuronali) produce un effetto sul peso corporeo, sul comportamento alimentare e sulla capacità di ossidare i lipidi in animali di controllo, ma non ha nessun effetto in animali conditional knockout per il recettore CB1 neuronale. La seconda evidenza è rappresentata dal confronto del fenotipo di topi conditional knockout per il recettore CB1 neuronale, con topi che presentano delezione completa del recettore in tutto l'organismo. Al termine di un prolungato periodo di somministrazione di dieta grassa, è stato dimostrato come il fenotipo dei due modelli animali sia indistinguibile. Entrambi i modelli murini presentano infatti una resistenza all'accumulo di peso corporeo e massa grassa indotta dalla dieta grassa, ed un simile miglioramento del profilo metabolico generale.

Quindi, la capacità del sistema endocannabinoide di controllare l'omeostasi energetica, dipende fortemente dal recettore CB1 espresso a livello neuronale, in quanto la delezione del recettore CB1 in queste popolazioni cellulari ha un effetto sul metabolismo generale paragonabile all'effetto ottenuto bloccando (per via genetica o per via farmacologica) il recettore CB1 in tutto l'organismo. Come descritto nell'introduzione, i farmaci CB1 antagonisti sono strumenti terapeutici efficaci per limitare l'accumulo di massa grassa e peso corporeo nell'obesità, ma producono anche eventi avversi di natura psichiatrica, a causa della loro capacità di agire nel sistema nervoso centrale.

La possibilità di produrre farmaci CB1 antagonisti che agiscano selettivamente in alcuni distretti anatomici (senza ad esempio intaccare il SNC), potrebbe rappresentare una valida alternativa per preservare gli effetti terapeutici di questi farmaci senza tuttavia ottenere gli effetti negativi sull'umore. I dati ottenuti in questo studio dimostrano che eventuali approcci terapeutici basati su nuovi farmaci CB1 antagonisti selettivi devono necessariamente agire sul recettore CB1 neuronale per poter essere efficaci nel ridurre peso corporeo e le alterazioni metaboliche durante l'obesità.

L'analisi del fenotipo di topi conditional knockout per il recettore CB1 mette inoltre in luce nuovi meccanismi attraverso cui gli endocannabinoidi possono agire per regolare l'omeostasi energetica ed il peso corporeo. I dati ottenuti in questo lavoro, dimostrano infatti che il blocco del recettore CB1 espresso nei neuroni del forebrain e simpatici, ha una azione di controllo sul peso corporeo che dipende da un'aumentata termogenesi, da una maggiore capacita' di ossidazione lipidica e da un'aumentata eliminazione dell'energia introdotta dall'organismo attraverso le feci.

Il meccanismo alla base della capacita' di CB1 neuronale di controllare il metabolismo generale sembrerebbe dipendere da una azione di modulazione del SNS periferico infatti i topi conditional knockout presentano un aumentato tono simpatico, ed eliminando l'attivita' funzionale del SNS periferico viene meno la capacita' del recettore CB1 neuronale di stimolare la termogenesi e la funzionalita' del BAT. Il blocco di CB1 nei neuroni, quindi, produce un'iperattivazione del SNS periferico che a sua volta regola il metabolismo di organi periferici (come il BAT) e l'omeostasi energetica generale.

Alla luce della dimostrazione che il fenotipo magro dei topi conditional knockout diventa particolarmente evidente in condizioni di dieta grassa tanto da essere simile al fenotipo di topi con delezione totale del recettore, e' possibile interpretare piu' approfonditamente la relazione esistente tra recettore CB1 neuronale e SNS periferico in seguito ad alimentazione ipercalorica. L'esposizione alla dieta grassa e' nota infatti stimolare la produzione di endocannabinoidi (56) e l'aumentato livello di queste molecole endogene comporterebbe una aumentata azione sul recettore CB1 neuronale presente in neuroni del forebrain e simpatetici, che a sua volta va a ridurre il tono simpatico periferico e l'efficienza energetica dell'organismo.

CAPITOLO 7- Risultati e conclusioni: Tessuto adiposo bruno e controllo della sensibilità insulinica

7.1 Analisi della funzionalità del BAT con PET/CT in animali con obesità indotta da dieta.

Il secondo progetto del dottorato ha riguardato lo studio della relazione esistente tra obesità indotta da dieta e sensibilità insulinica nel BAT. Attraverso PET/CT imaging in associazione al tracciante ^{18}F -FDG, è stata studiata l'attività funzionale del BAT in condizione basale e in condizione di stimolo insulinico in topi magri ed in topi con progressivi livelli di obesità indotta da dieta. La valutazione dei livelli glicemici degli animali durante la procedura di imaging, ha permesso di studiare la capacità dell'insulina di influenzare i livelli di glucosio ematico totale durante la procedura, in modo da poter mettere in relazione la sensibilità insulinica totale con quella del BAT nei vari gruppi di animali (SD, HFD, SHFD). Come indicato in figura 12A, i livelli di glucosio ematico calcolati durante la sessione sperimentale basale (procedura PET/CT effettuata in assenza di trattamento con insulina) rimangono pressochè costanti per tutti e 3 i gruppi di animali. La procedura di imaging utilizzata quindi, non è di per sé causa di modificazioni nei livelli del glucosio ematico, che potrebbero essere dovute ad esempio allo stress dell'animale.

Durante la seconda sessione sperimentale invece, (0,7 U/kg di insulina iniettati subito dopo l'iniezione del tracciante PET) si osserva un drastico calo della glicemia negli animali in dieta standard e negli animali in condizione di media obesità (HFD) in corrispondenza della fase della captazione del tracciante PET (figura 12B). L'insulina tuttavia non produce nessun effetto nel glucosio ematico degli animali SHFD, (figura 12B) indicando come la condizione estrema di obesità indotta dalla dieta porti allo sviluppo di insulino resistenza a livello globale in questi animali.

Per studiare la sensibilità insulinica regionale nel BAT, la procedura di fusione PET/CT (rappresentata graficamente in figura 12C) è stata utilizzata in modo da quantificare l'attività metabolica del BAT attraverso il parametro SUV nelle due condizioni sperimentali (basale e insulino-stimolata). Come indicato nelle figure 12D e 12E, l'uptake di ^{18}F -FDG calcolato nel

BAT di animali SD attraverso il parametro SUV, risulta essere fortemente aumentato in seguito a trattamento con insulina rispetto alla condizione basale. L'aumento del segnale indotto dall'insulina sembra essere ridotto negli animali HFD (pur rimanendo ancora statisticamente significativo) ed è completamente assente negli animali SHFD. Parallelamente all'osservazione della compromessa sensibilità insulinica generale negli animali SHFD, si osserva quindi una ridotta funzionalità insulinica nel BAT di questi animali.

7.2 Valutazione della sensibilità insulinica nel BAT tramite PET/CT imaging in condizioni di euglicemia.

Nel paragrafo precedente è stato descritto come la procedura PET/CT permetta di studiare in modo non invasivo la funzionalità insulinica nel BAT in condizioni fisiologiche e patologiche, come l'obesità indotta da dieta.

E' possibile tuttavia che meccanismi contro-regolatori, originati dall'abbassamento della glicemia plasmatica, prodotta dalla somministrazione di insulina possano influenzare, con questo approccio sperimentale, l'analisi dell'uptake del BAT. In seguito ad un severo abbassamento della glicemia plasmatica infatti, l'organismo reagisce producendo ormoni contro-regolatori come il glucagone e l'adrenalina, che agiscono ripristinando i livelli di glucosio fisiologicamente presenti nel plasma ed influenzando l'attività metabolica di diversi organi periferici tra cui il BAT. Al fine di analizzare l'effetto di possibili meccanismi ormonali contro-regolatori, nella valutazione del metabolismo del BAT con la metodica PET/CT, la procedura di imaging precedentemente utilizzata è stata ripetuta su nuovi gruppi di animali in cui si è mantenuta la condizione di euglicemia (mantenimento costante dei livelli di glucosio plasmatico). A tal fine un catetere venoso è stato inserito per via chirurgica negli animali e del glucosio esogeno (glucosio al 10%) è stato infuso attraverso una pompa peristaltica dopo aver somministrato l'insulina. La procedura di infusione del glucosio esogeno, come si può vedere in figura 13A ed 13B, permette effettivamente di ottenere la condizione di euglicemia durante la procedura PET/CT. Il glucosio totale calcolato durante la fase di biodistribuzione del tracciante infatti, è comparabile tra la condizione basale e la condizione di stimolo insulinico per entrambi i gruppi di animali SD e SHFD. Analizzando il tasso di infusione del glucosio esogeno necessario per mantenere stabile la glicemia plasmatica, viene confermata la presenza di una ridotta sensibilità

insulinica generale negli animali in SHFD. Il parametro GIF (rate di infusione del glucosio) infatti, è significativamente ridotto negli animali in SHFD rispetto agli animali SD (figura 13C). L'analisi dell'uptake di ^{18}F -FDG nel BAT durante la condizione di euglicemia, conferma la presenza di un' alterata sensibilità insulinica nel BAT degli animali SHFD, rispetto agli animali SD (figura 13D). I valori di SUV che si ottengono nei vari gruppi sono paragonabili ai valori ottenuti durante il precedente approccio in assenza di bilanciamento glicemico.

La presenza di meccanismi controregolatori indipendenti dall'azione dell'insulina quindi, non influenzano con questo approccio di imaging la valutazione della sensibilità insulinica. I risultati ottenuti in questa seconda condizione di bilanciamento glicemico inoltre, confermano che l'obesità indotta da dieta è una condizione patologica in cui la funzionalità insulinica nel BAT risulta compromessa.

7.3 CONCLUSIONI

Da questo studio emerge come la metodologia PET/CT possa permettere l'analisi, *in vivo*, della sensibilità insulinica nel BAT. La sovrapposizione spaziale di immagini PET con immagini CT (procedura di 'fusione'), permette di localizzare esattamente la regione anatomica corrispondente al BAT e quantificarne l'attività metabolica. Utilizzando il tracciante radioattivo ^{18}F -FDG è stato mostrato come sia possibile ottenere informazioni numeriche (attraverso la quantificazione del segnale nelle immagini di fusione) relative alla capacità dell'insulina di stimolare l'uptake di glucosio nel tessuto.

L'insulina determina un forte aumento del segnale (uptake di ^{18}F -FDG) nel BAT di topi alimentati con normale dieta di laboratorio e questo aumento è indipendente dalla presenza di risposte ormonali contro-regolatorie derivanti dall'ipoglicemia che si origina in seguito all'azione dell'insulina.

L'aumento dell'uptake di ^{18}F -FDG prodotto dall'insulina, infatti, non cambia e rimane della stessa intensità quando gli animali vengono studiati in condizione di euglicemia, mantenendo cioè il glucosio ematico nei normali livelli fisiologici. Viene mostrato inoltre come la procedura PET/CT permetta di studiare l'animale nel suo contesto fisiologico e non induce evidenti segni di stress. La tipica risposta allo stress, che si osserva nel topo quando vengono effettuate procedure invasive, consiste nell'innalzamento dei livelli plasmatici di catecolamine che comporta un aumento della glicemia plasmatica. La constatazione che gli animali posseggono livelli di

glucosio stabili e nel range fisiologico durante la procedura PET/CT, permette di escludere questa possibilita'.

Analizzando l'effetto dell'insulina in animali con obesita' indotta da dieta, si e' osservata una completa incapacita' dell'ormone di stimolare l'uptake di ^{18}F -FDG nel BAT in entrambi gli approcci sperimentali (con e senza bilanciamento glicemico). Il significato funzionale della mancata capacita' dell'insulina di stimolare l'uptake di glucosio nel BAT di topi obesi rimane ancora da definire, tuttavia questo dato rappresenta la prima evidenza *in vivo* dell'esistenza di un'alterata capacita' dell'insulina di regolare l'uptake di glucosio nel BAT di individui obesi.

CAPITOLO 8- Considerazioni finali

In questo lavoro di tesi vengono da un lato mostrate le potenzialita' applicative, in studi di tipo metabolico, delle metodiche di imaging molecolare PET e TAC per piccoli animali, mentre dall'altro lato vengono messi in luce nuovi aspetti sui meccanismi fisiologici e patologici che regolano il controllo dell'omeostasi energetica, l'accumulo di grasso e di peso corporeo durante l'obesita'. Viene mostrato come il sistema endocannabinoide possa agire attraverso il recettore CB1 neuronale e determinare un profondo effetto sul metabolismo generale, in termini di controllo dell'omeostasi energetica e di regolazione del profilo metabolico. La capacita' del recettore CB1 neuronale di mediare questi effetti e' strettamente dipendente dalla sua capacita' di regolare l'attivita' nervosa simpatica sugli organi periferici; in questo senso il BAT sembra essere fortemente influenzato da questo sistema di controllo che origina dal recettore CB1 neuronale e che ha come importante mediatore il SNS. Questi risultati, che mostrano una stretta relazione esistente tra sistema endocannabinoide e termogenesi del BAT, evidenziano come il BAT possa avere un ruolo importante nel controllare la massa grassa ed il peso corporeo degli individui obesi.

Un ulteriore aspetto emergente da questo lavoro di tesi e' che questo tessuto potrebbe avere un ruolo nel controllare la sensibilita' insulinica in condizione di obesita' indotta da dieta. E' stato dimostrato infatti come l'insulina possa agire in modo significativo nel regolare l'uptake di glucosio nel BAT e come l'obesita' indotta da dieta sia caratterizzata da una ridotta funzionalita' insulinica in questo tessuto.

Recenti evidenze sperimentali, sebbene preliminari, indicano come l'insulina possa stimolare allo stesso livello del muscolo scheletrico, l'uptake di glucosio nel BAT di esseri umani adulti sani (non obesi) (21). Alla luce di queste evidenze e dei dati presentati in questo lavoro di tesi, e' possibile quindi che negli esseri umani il BAT possa andare incontro ad una alterata funzionalita' insulinica in seguito ad obesita'. Questo tessuto, quindi, potrebbe rappresentare un nuovo target per controllare disregolazioni metaboliche che si originano in seguito ad obesita', come la resistenza insulinica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) World Health Organization. Fact sheet: obesity e overweight. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>
- 2) MH Tschoep (Ed) *Obesitext*. <http://www.Endotext.org>
- 3) Moran TH. Gut peptides in the control of food intake. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2009; 33 Suppl 1:S7-10.
- 4) Kadowaki T et al. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 2005; 26(3):439-451.
- 5) Oh DK et al. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes. Metab.* 2007; 9(3):282-289.
- 6) Patti ME et al. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2010; 31:364-395.
- 7) Sparks JD et al. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994; 1215:9-32.
- 8) Kelley DE et al. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1999; 277: E1130–E1141.
- 9) Zurlo F et al. Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1990; 259: E650–E657.
- 10) Krief S et al. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.* 1993; 91(1):344-9.
- 11) Van Baak MA. The peripheral sympathetic nervous system in human obesity. *Obes. Rev.* 2001; 2(1):3-14.
- 12) Bray GA. Sympathetic nervous system, adrenergic receptors, and obesity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1999; 134:4-6.
- 13) Grujic D et al. Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:17686-93.
- 14) Cannon B et al. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004; 84:277-359.
- 15) Barbatelli G et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010; 298:E1244–E1253.

- 16) Petrovic N et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:7153–7164.
- 17) Virtanen KA et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360:1518–1525.
- 18) Saito M et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes.* 2009; 8:1526–1531.
- 19) Feldmann V, et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009; 9:203–209.
- 20) Cannon B et al. Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight control. *Proc Nutr Soc.* 2009; 68(4):401-7.
- 21) Virtanen, K.A. et al. Brown adipose tissue in humans. *Curr. Opin. Lipidol.* 2011; 22(1):49-54.
- 22) Bartelt A et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 2011; 17(2):200-5.
- 23) Storlien LH et al. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 251; 1986:E576–E583.
- 24) Pertwee R. G et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62:588-631.
- 25) Di Marzo V et al. Leptin regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 2001; 410: 822–825.
- 26) Matias I et al. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91:3171–3180.
- 27) Pagano C et al. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium⁵⁴⁰ dependent mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 92:4810-4819.
- 28) Bellocchio L et al. Cannabinoid receptors as therapeutic targets for obesity and metabolic diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6:586–591.
- 29) Quarta C et al. CB1 Signaling in Forebrain and Sympathetic Neurons Is a Key Determinant of Endocannabinoid Actions on Energy Balance. (2010) *Cell Metabolism.* 4, 273-285.

- 30) Osei-Hyiaman D et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:1298-1305.
- 31) Matias I. et al. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008; 286 (Suppl 1), S66-78.
- 32) Pagotto U. et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 2006; 27:73-100.
- 33) Verty A.N. et al. Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)- tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology.* 2005; 49:1101-1109.
- 34) Richard D. et al. The brain endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 23:17-32.
- 35) Kola B. et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One.* 2008; 3(3) e1797.
- 36) Di Marzo V. et al. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 2005; 8:585-589.
- 37) Burdyga G. et al. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J. Neurosci.* 2004; 24:2708–2715.
- 38) Gómez, R. et al. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J. Neurosci.* 2002; 22:9612–9617.
- 39) Colombo G. et al. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 1998; 63:113-117.
- 40) Ravinet-Trillou C. et al. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 284:R345-353.
- 41) Doyon C. et al. Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats. *Diabetes.* 2006;55:3403-3410.
- 42) Wagner J.D. et al. A selective cannabinoid-1 receptor antagonist, PF-95453, reduces body weight and body fat to a greater extent than pair-fed controls in obese monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010;335:103-113.
- 43) Addy C. et al. The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab.* 2008; 7:68-78.

- 44) Vettor R. et al. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 23:51-63.
- 45) Tedesco L. et al. Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes.* 2008;57:2028-2036.
- 46) Tedesco L. et al. Cannabinoid 517 receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. *Diabetes* 2010; 59:2826-2836.
- 47) Liu Y.L. et al. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int. J. Obes.* 2005; 29:183-1837.
- 48) Osei-Hyiaman D. et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* 2008; 118:3160-3169.
- 49) Voss-Andreae A. et al. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology.* 2007; 14:1550–1560.
- 50) Song C.K. et al. Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 295(2):R417-28.
- 51) Perwitz N. et al. Cannabinoid receptor signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. *Horm. Metab. Res.* 2006; 38:356-358.
- 52) Verty A.N. et al. The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 17: 254-261.
- 53) Perwitz N. et al. Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes. Metab.* 2010; 12,158-166.
- 54) Després J.P. et al. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353:2121-2134.
- 55) Bermúdez-Silva F.J. et al. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* 2008; 54:476-487.
- 56) Kunos G. et al. Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2008. 283;33021:33025.

- 57) Esposito I. et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant stimulates 2-deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating the expression of phosphatidylinositol-3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 2008; 74:1678-1686.
- 58) Eckardt, K. et al. Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. *Diabetologia* 2009; 52:664-674.
- 59) Lindborg K.A. et al. Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes. Metab.* 2010; 12:722-730.
- 60) Lipina C. et al. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes* 2010; 59:375-385.
- 61) Li C. et al. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas *Pharmacol. Ther.* Nov 2010;3 Epub ahead of print.
- 62) Van Gaal L. et al. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1- year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008; 31:Suppl 2, S229-240.
- 63) Christensen R. et al. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant; a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2007; 370:1706-1713.
- 64) Tam J. et al. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J. Clin. Invest.* 2010; 120:2953-66.
- 65) Sokoloff L. et al. The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.* 1977; 28(5):897-916.
- 66) Nuutila P. et al. Effect of antilipolysis on heart and skeletal muscle glucose uptake in overnight fasted humans. *Am. J. Physiol.* 1994; 267(6 Pt 1):E941-6.
- 67) Gambhir S.S. et al. Simple noninvasive quantification method for measuring myocardial glucose utilization in humans employing positron emission tomography and fluorine-18 deoxyglucose. *J Nucl Med.* 1989; 30(3):359-66.
- 68) Virtanen K.A. et al. Increased fat mass compensates for insulin resistance in abdominal obesity and type 2 diabetes: a positron-emitting tomography study. *Diabetes.* 2005; 54(9):2720-6.
- 69) Virtanen K.A. et al. Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 2003 Feb; 52(2):283-90.

- 70) Maki M.T. et al. Free fatty acid uptake in the myocardium and skeletal muscle using fluorine-18-fluoro-6-thia-heptadecanoic acid. *J Nucl Med.* 1998; 39(8):1320-7.
- 71) Virtanen K.A. et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(8):3902-10.
- 72) Marsicano G. et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature.* 2002; 418: 530-534
- 73) Marsicano G. et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity *Science.* 2003; 3:84-88.
- 74) Strecker T. et. al. Release of calcitonin gene-related peptide from jugular-nodose ganglion complex in rats - A new model to examine the role of cardiac peptidergic and nitrenergic innervation. *Neuropeptides.* 2008; 42:543-550.
- 75) Wittmann G. et al. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 2007; 503:270-279.
- 76) Fukudome Y. et al. Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19:2682-2692.
- 77) Makara J.K. et al. Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors. *J. Neurosci.* 2007; 27:10211-22.
- 78) Wager-Miller, J. et al. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem. Phys. Lipids.* 2002; 121:83-89.
- 79) Grossi G. et al. Improvements in automated analysis of catecholamine and related metabolites in biological samples by column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991; 22:273-84.
- 80) Pallotti F et al. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. In *Mitochondria.* Pon LA, Schon EA, Eds. San Diego, Academic Press. 2001; p.1 – 35.
- 81) Nisoli E. et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 2003; 299:896 –899.
- 82) Lopez-Lluch G. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:1768 –1773.

- 83) Thackeray, J.T. et al. Presence of specific ¹¹Cmeta- Hydroxyephedrine retention in heart, lung, pancreas, and brown adipose tissue. *J. Nucl. Med.* 2007; 48:1733-1740.
- 84) Templeton A. et al. Chemical sympathectomy increases susceptibility to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of Neuroimmunology.* 2008; 197:37–46.
- 85) Härle P. et al. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2005; 52:1305-1313.
- 86) Obici S. et al. Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J. Clin. Invest.* 2001; 108:1079–1085.
- 87) Casanova E. et al. A CamKIIa iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis.* 2001; 31:37-42.
- 88) Grill H.J. et al. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int. J. Obes.* 2009; 33 Suppl 1, S11-15.
- 89) Tsou K. et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83:393-411.
- 90) Herling A.W. et al. Increased energy expenditure contributes more to the body weight-reducing effect of rimonabant than reduced food intake in candy-fed wistar rats. *Endocrinology.* 2008;149:2557-2566.

ANNEX

La gran parte del progetto sperimentale è stata effettuata presso il Centro di Ricerca Biomedica Applicata (C.R.B.a) U.O di Endocrinologia, Ospedale S.Orsola-Malpighi, Bologna, e presso i laboratori di imaging preclinico dell' U.O. di Medicina Nucleare, Ospedale S.Orsola-Malpighi, Bologna. Grazie ai numerosi strumenti presenti ed alle diverse professionalità dei due centri, si è potuta consolidare l'esperienza nelle metodiche di imaging preclinico PET e TAC ma anche in metodiche di biologia molecolare di base.

Una parte del dottorato inoltre è stata effettuata presso il Metabolic Disease Institute, University of Cincinnati, Cincinnati, OHIO, USA (Prof. Silvana Obici) dove sono state apprese metodiche di studio del metabolismo glucidico nel topo come il clamp euglicemico iperinsulinemico.

Pubblicazioni in esteso effettuate durante il periodo del dottorando:

- **Quarta C.**, Bellocchio L., Mancini G., Mazza R., Cervino C., Braulke L.J., Fekete C., Latorre R., Nanni C., Bucci M., Clemens E.L., Heldmaier G., Watanabe M., Leste-Lassere T., Maitre M., Tedesco L., Fanelli F., Reuss S., Klaus S., Srivastava R.K., Monory K., Valerio A., Grandis A., De Giorgio R., Pasquali R., Nisoli E., Cota D., Lutz B., Marsicano G., Pagotto U. CB1 signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. (2010) Cell Metabolism. **4**, 273-285.
- Domenicali M., Caraceni P., Giannone F., Baldassarre M., Lucchetti G., **Quarta C.**, Patti C., Catani L., Nanni C., Lemoli R.M., Bernardi M. A novel model of CCl4-induced cirrhosis with ascites in the mouse. (2009). Journal of Hepatology. **51**, 991-9.
- Pagotto U., Vicennati V., di Dalmazi G., **Quarta C.**, Baccini M. Pasquali R. The antagonists of cannabinoid receptor type 1 as anti-obesity target: is the game really over? Obesity and Metabolism (in press).

- **Quarta C.**, Mazza R., Obici S., Pasquali R., Pagotto U. Endocannabinoids and obesity: a neverending story. Trends in Molecular Medicine. Submitted.

CONGRESSI INTERNAZIONALI

COMUNICAZIONI ORALI

- **Quarta C.**, Bellocchio L., Mancini G., Mazza R., Cota D., Lutzie J., Braulke, Fekete C., Nisoli E., Pasquali R., Lutz B., Marsicano G., Pagotto U. “The endocannabinoid action in the regulation of energy balance is mainly due to the CB1 receptor in the forebrain neurons”. (2010) Highlight session at the European Congress of Endocrinology, Prague, Czech, Republic.

POSTER

- **Quarta C.**, Cervino C., Bucci M., Nanni C., Ambrosini V., Fanti S., Pasquali R., Pagotto U. “Quantification of Content and distribution of fat depots in Whole and neuronal CB1 receptor Knock-Out mice.” (2008) European Congress of Nuclear Medicine, Munich (Germany).
- **Quarta C.**, Giannone F., Domenicali M., Caraceni P., Nanni C., Ambrosini V., Trespidi S., Pagotto U., Fanti S. “In-Vivo evaluation of liver Cirrhosis in Rats with Small Animal PET”. (2008) European Congress of Nuclear Medicine, Munich (Germany).
- **Quarta C.**, Giannone F., Domenicali M., Nanni C., Ambrosini V., Trespidi S., Pagotto U., Fanti S. “Longitudinal Evaluation of Liver Cirrhosis in Rats with Small Animal Pet”. (2008) World Molecular Imaging Congress, Nice (France).
- **Quarta C.**, Bucci M., Nanni C., Cervino C., Vicennati V., Gambineri A., Iozzo P., Nuutila P., Pasquali R., Fanti S., Pagotto U. “Small Animal Imaging: The use of PET/CT fusion to in vivo and longitudinally assess the anti-obesity drug effects on FDG uptake in mice target tissues. (2007) Highlight poster session American Diabetes Association, Chicago, IL, USA.

- **Quarta C.**, Bucci M., Nanni C., Cervino C., Vicennati V., Gambineri A., Iozzo P., Nuutila P., Pasquali R., Pasquali R., Fanti S., Pagotto U. “The use of PET/CT fusion to assess the anti-obesity drug effects on FDG uptake target tissues of obese mice”. (2007) Endocrine Society Congress, Toronto, Canada.

CONGRESSI NAZIONALI

COMUNICAZIONI ORALI

- **Quarta C.**, Nanni C., Boschi S., Mazza R., Ambrosini V., Pasquali R., Fanti S., Pagotto U. “Usefulness of small animal Positron emission tomography/Computed tomography to non invasively analyse insulin sensitivity in diet induced obese mice”. (2010). Simposio “Imaging e Medicina traslazionale”. Imola (Bologna), Italy.

- **Quarta C.**, Cervino C., Bellocchio L., Mariani C.V., Mancini G., Braulke L., De Giacomo A.J., Lutz B., Marsicano G., Pasquali R., Pagotto U. “La delezione specifica neuronale del recettore 1 dei cannabinoidi è fondamentale per il controllo del peso corporeo”. (2009) Comunicazione orale tra quelle selezionate per la sessione plenaria al 34° Congresso Italiano della Società Italiana di Endocrinologia Sorrento (Napoli).

POSTER

- **Quarta C.**, Nanni C., Boschi S., Mazza R., Ambrosini V., Pasquali R., Fanti S., Pagotto U. “Small animal PET imaging of brown adipose tissue functional activity with ¹¹C-meta-hydroxyephedrine.” (2010). Simposio “Imaging e Medicina traslazionale”. Imola (Bologna).

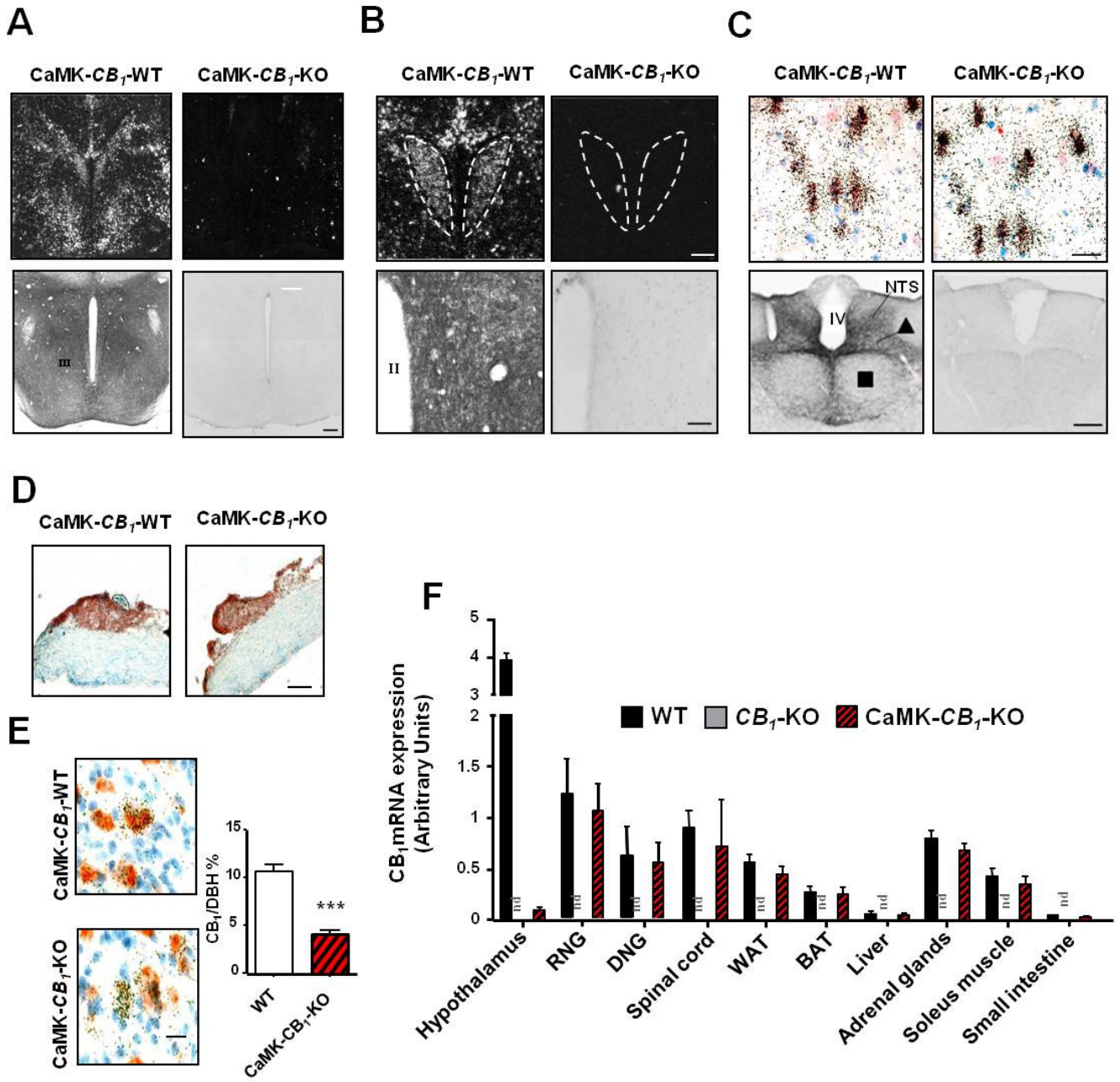
- **Quarta C.**, Bucci M., Nanni C., Cervino C., Vicennati V., Gambineri A., Iozzo P., Nuutila P., Pasquali R., Pasquali R., Fanti S., Pagotto U. “Small Animal Imaging: The use of PET/CT fusion to in vivo and longitudinally assess the anti-obesity drug effects on FDG uptake in mice target

tissues”. (2009) 34° Congresso Italiano della Società Italiana di Endocrinologia Sorrento (Napoli).

PREMI

Vincitore del premio della Società Europea di Endocrinologia come miglior comunicazione in occasione del dodicesimo Congresso Europeo della Società Europea di Endocrinologia (ESE), Praga 2010.

Figura 3



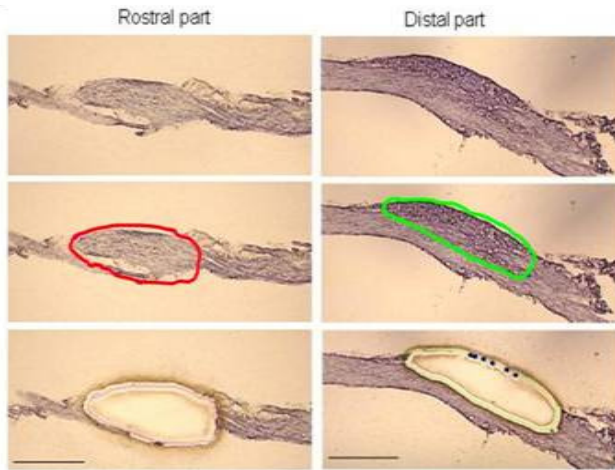
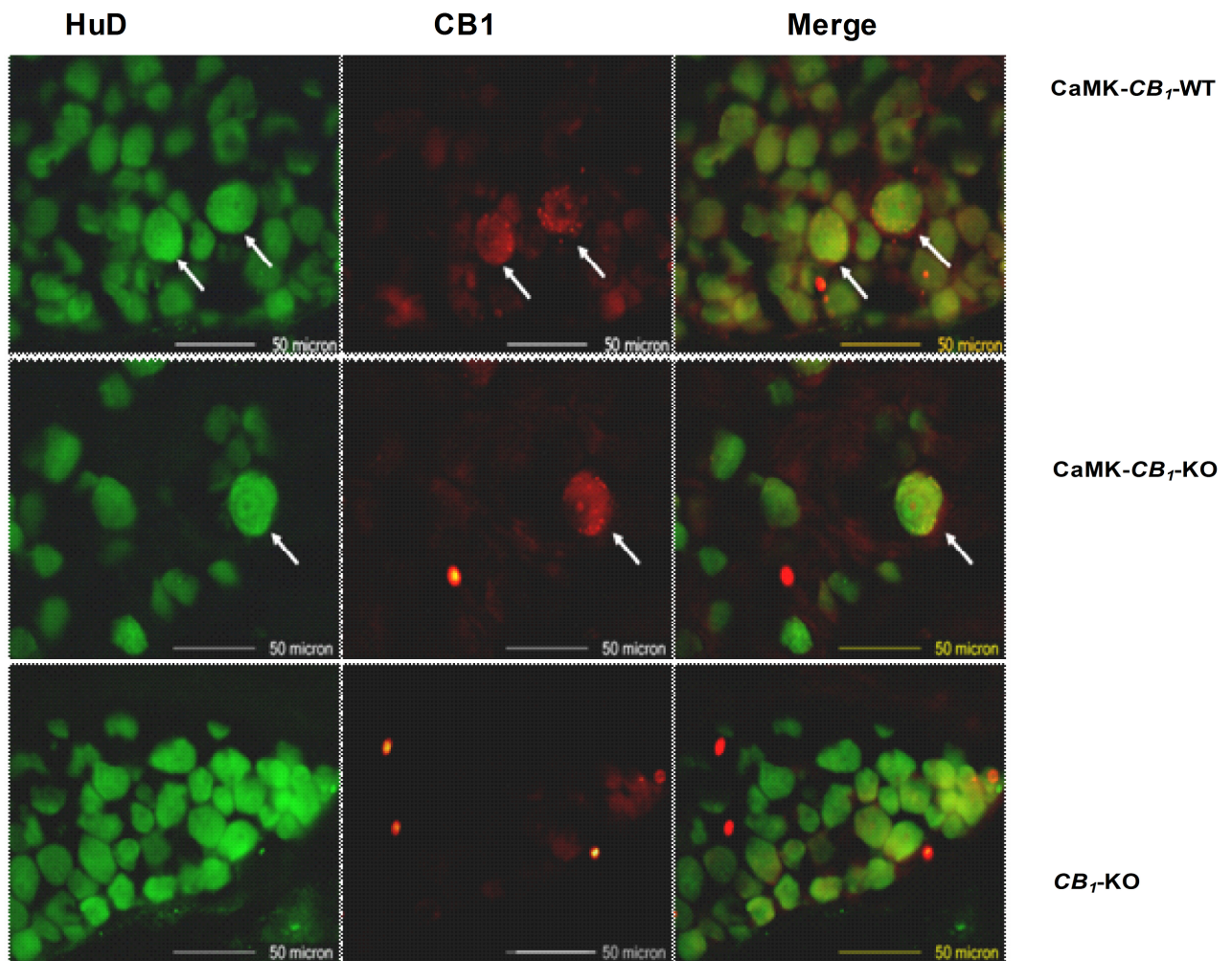
G**H**

Figura 3: Valutazione dell'espressione e della distribuzione di CB1 (mRNA e proteina) in topi CaMK-CB1-KO.

(A) Analisi dell'espressione dell'mRNA di CB1 tramite ibridizzazione in situ (ISH) (pannelli superiori) e dello staining della proteina CB1 tramite immunohistochimica (IHC) (pannelli inferiori), nell'intero ipotalamo di topi CaMK-CB1-KO e CaMK-CB1-WT. Scale bar =200µm.

(B) ISH (pannelli superiori) e IHC (pannelli inferiori) per il CB1 nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN, linea tratteggiata). Scale bar =50µm. Il simbolo (III) indica il terzo ventricolo.

(C) Pannelli superiori: doppia ibridazione in situ (DISH) per valutare l'espressione dell'mRNA di CB1 (in nero) e di glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (in rosso) nel nucleo del tratto solitario (NTS). Scale bar =30µm. Pannelli inferiori: valutazione della presenza della proteina CB1 nell'NTS. ▲ rappresenta il nucleo motore dorsale del vago, ■ rappresenta il nucleo hypoglossale, (IV) rappresenta il quarto ventricolo. Scale bar = 200 µm.

(D) ISH, per valutare l'espressione dell'mRNA di CB1 (in rosso) nel ganglio nodoso. Scale bar = 50 µm.

(E) DISH, per valutare l'espressione dell'mRNA di CB1 (in nero) e di dopamina-β-idrossilasi (DBH) (in rosso) ed analisi Real Time PCR del rapporto tra CB1/DBH mRNA nei gangli superiori cervicali simpatici. Scale bar = 1.5 µm. L'analisi è stata effettuata su 4 gangli per gruppo e i dati presentati sono espressi come media ± deviazione standard della media (SEM). *** $p \leq 0,0005$.

(F) Analisi in Real Time PCR dell'espressione dell'mRNA di CB1 nell'ipotalamo ed in diversi tessuti periferici di topi CaMK-CB1-WT, CaMK-CB1-KO e CB1-KO usati come controlli negativi (n=6 per genotipo). WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue, RNG =ganglio nodoso rostrale, DNG = ganglio nodoso distale, n.d. non rilevabile. I dati presentati sono espressi come media ± SEM.

(G) Dimostrazione grafica della procedura di isolamento del ganglio nodoso (porzione rostrale a sinistra, porzione distale a destra) attraverso microlaser dissection. Scale bar = 300 µm.

(H) Analisi tramite immuofluorescenza dell'espressione di CB1 (in rosso) e del marker neuronale Hu antigen D (HuD, in verde) nella porzione rostrale e distale del ganglio nodoso di topi WT, CaMK-CB1-KO e CB1-KO. Le frecce indicano i corpi cellulari positivi per CB1.

Figura 4

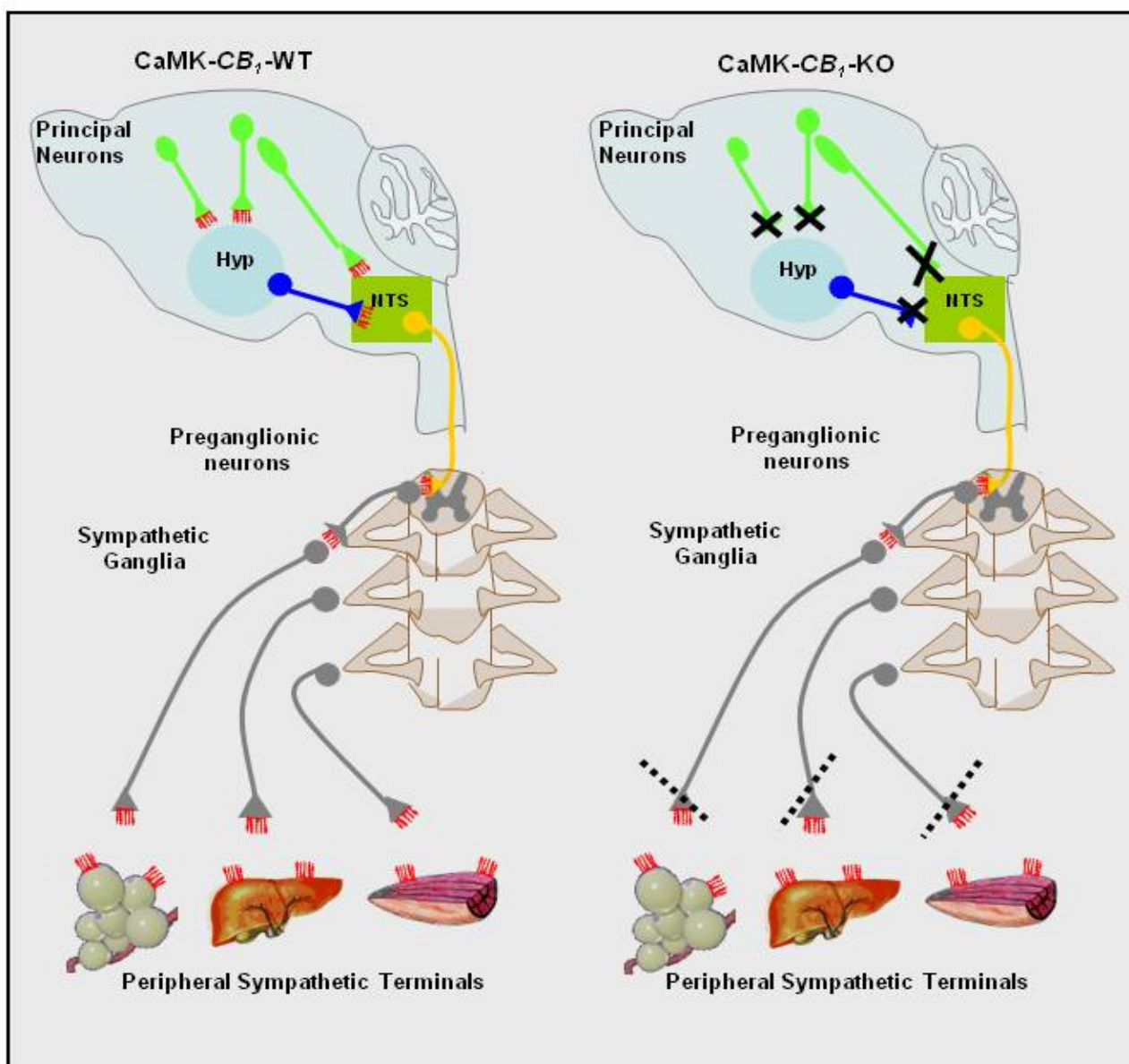


Figura 4: Rappresentazione schematica delle aree di delezione di CB1 in topi CaMK-CB1-KO.

La proteina CB1 presinaptica è indicata in rosso, le croci rappresentano la delezione di CB1, mentre le linee tratteggiate la riduzione dell'espressione della proteina. Hyp: ipotalamo. NTS: nucleo del tratto solitario.

Figure 5

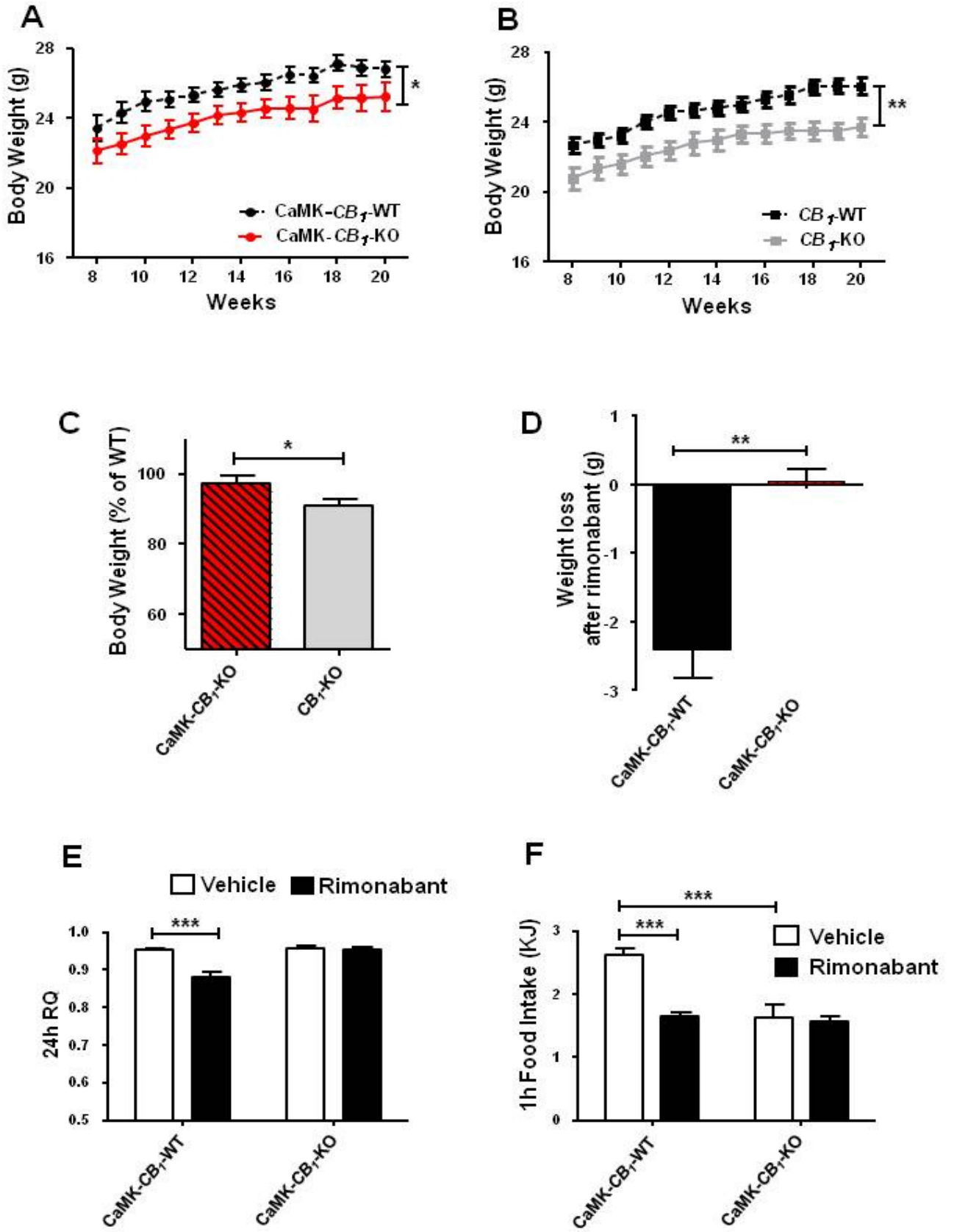


Figura 5: Caratterizzazione di topi CaMK-CBI-KO alimentati con dieta standard.

(A) Curve di peso per i topi CaMK-CBI-WT (●) e CaMK-CBI-KO (●), monitorati per 12 settimane durante alimentazione con dieta standard di laboratorio (SD). n = 18 per genotipo. *p < 0.05.

(B) Curve di peso per i topi CBI-WT (●) e CBI-KO (■) (topi con delezione completa di CB1), monitorati per 12 settimane durante alimentazione con dieta standard di laboratorio (SD). n = 18 per genotipo. **p < 0.005.

(C) Peso corporeo di topi CaMK-CBI-KO (barra rossa tratteggiata) e CBI-KO (barra grigia), espresso come percentuale rispetto ai topi WT ± SEM. I valori ottenuti per i topi WT dei due diversi modelli animali (CaMK-CBI-WT and CBI-WT) sono stati cumulati tra loro in questa analisi in quanto non statisticamente diversi. *p < 0.05.

(D) Riduzione di peso ottenuta in topi CaMK-CBI-WT (barra nera) (n = 6) e topi CaMK-CBI-KO (barra rossa tratteggiata) (n = 5), 24 ore dopo la somministrazione di rimonabant (10 mg/kg i.p.) **p < 0.005.

(E) Valutazione del quoziente respiratorio (RQ) medio calcolato per 2 giorni consecutivi (con misurazioni ogni ora) in topi CaMK-CBI-WT (n = 7) e CaMK-CBI-KO (n = 6). In corrispondenza del primo giorno gli animali sono stati trattati con veicolo, mentre il trattamento con rimonabant è avvenuto all'inizio del secondo giorno ***p < 0.0005. Le barre bianche rappresentano il trattamento con il veicolo mentre le nere corrispondono alla somministrazione del rimonabant.

(F) Valori di food intake (cumulati per 1 ora di misurazione) calcolati dopo un periodo di digiuno di 24 h in topi CaMK-CBI-WT (barra nera) e CaMK-CBI-KO (barra bianca) trattati con veicolo o rimonabant (3 mg/kg i.p.), rispettivamente. n= 10 per genotipo, ***p < 0.0005.

Tutti i dati in A, B, D, E, e F sono espressi come media ± SEM.

Figura 6

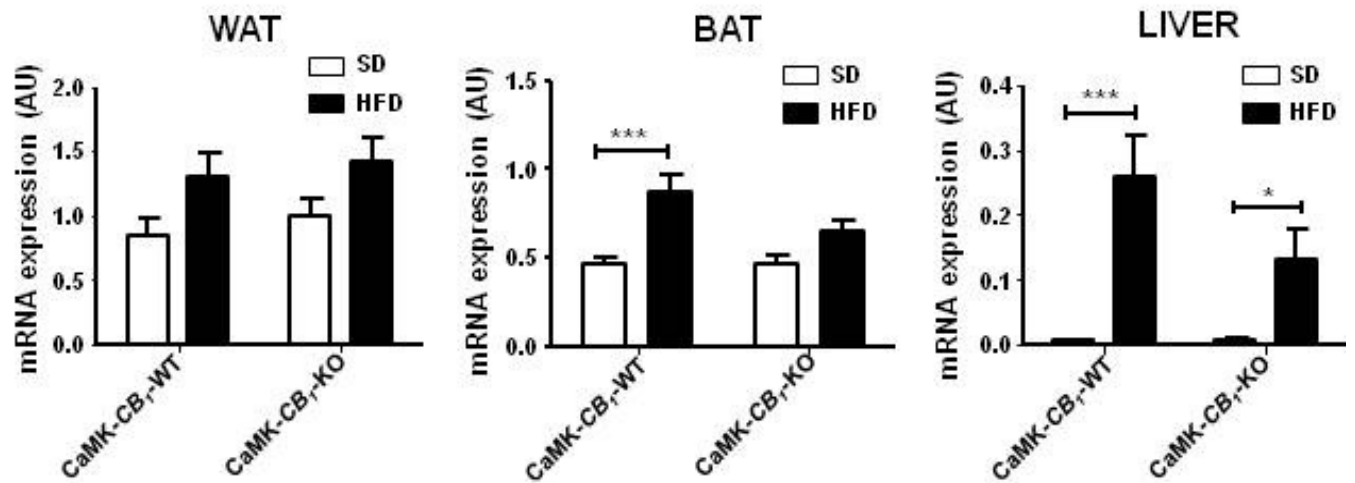
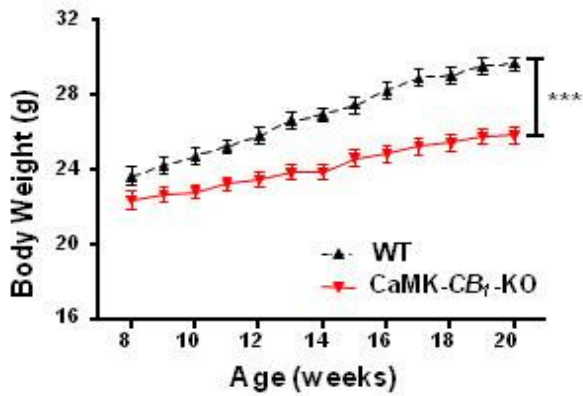


Figura 6: Caratterizzazione dell'espressione del recettore CB1 dopo somministrazione di dieta grassa.

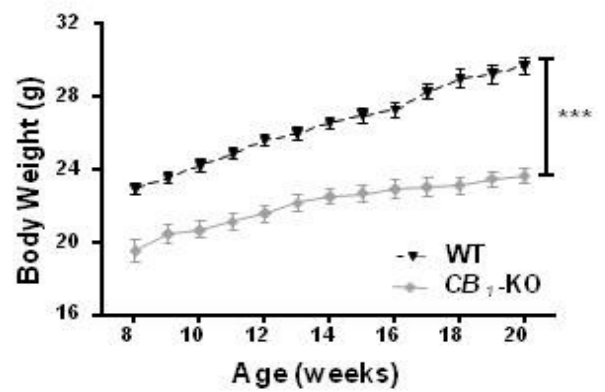
L'mRNA per CB1 è stato analizzato tramite Real Time PCR in tessuto adiposo bruno (BAT), fegato e tessuto adiposo bianco (WAT) di topi CaMK-CB₁-WT e CaMK-CB₁-KO, alimentati con dieta standard SD (barre bianche) o dieta grassa HFD (barre nere). N= 7 per genotipo. AU= arbitrary units.

Figura 7

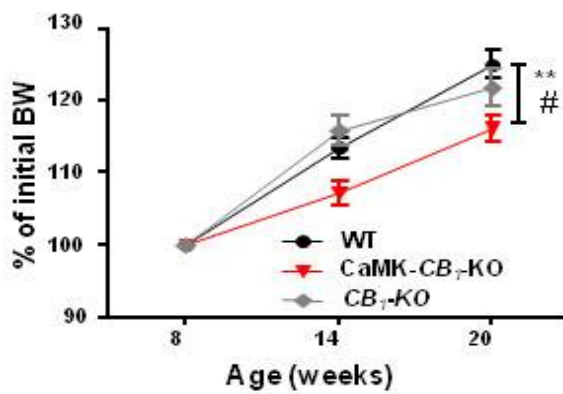
A



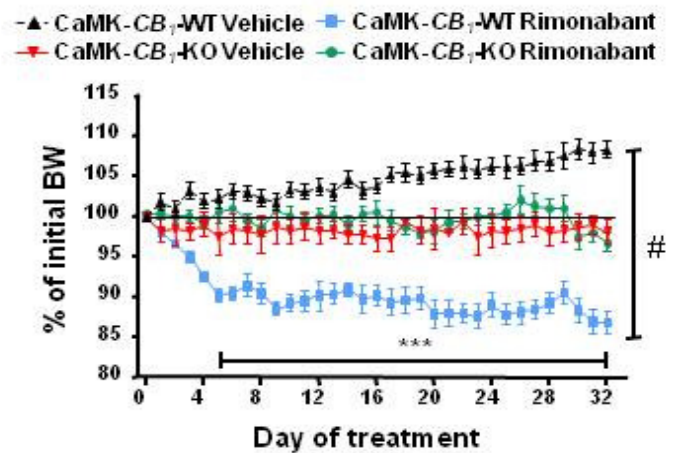
B



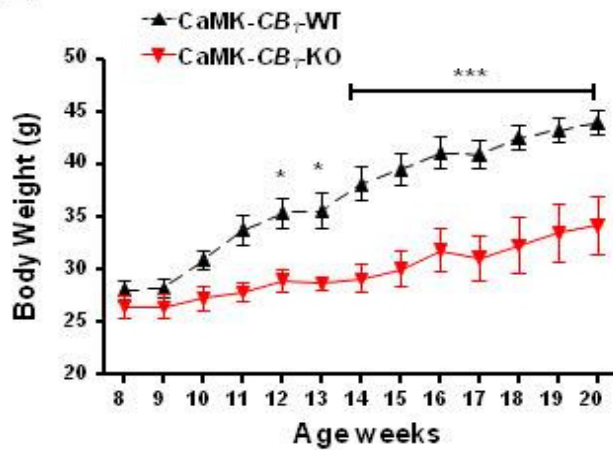
C



D



E



F

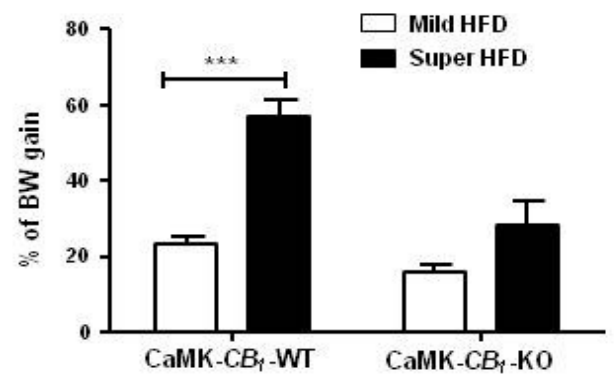


Figura 7: Caratterizzazione di topi CaMK-CBI-KO alimentati con dieta ipercalorica.

(A) Peso corporeo di topi CaMK-CBI-WT (▲) e CaMK-CBI-KO (▼) durante le 12 settimane di somministrazione di dieta ipercalorica (medio contenuto calorico, HFD). n = 24 per genotipo. ***p < 0.0005. I dati sono espressi come media ± SEM.

(B) Peso corporeo di topi CBI-WT (▼) (n = 25) e CBI-KO (◆) (n = 20) durante le 12 settimane di somministrazione di dieta HFD. n = 24 per genotipo. ***p < 0.0005. I dati sono espressi come media ± SEM.

(C) Calcolo del guadagno percentuale di peso (rispetto al peso iniziale) prodotto dalla dieta HFD in animali CaMK-CBI-KO (▼), CBI-KO (◆) e WT (●). **p < 0.005 CaMK-CBI-KO vs WT; # p < 0.05 CaMK-CBI-KO vs CBI-KO. I valori ottenuti per i topi CaMK-CBI-WT e CBI-WT sono stati cumulati in quanto non statisticamente diversi tra loro.

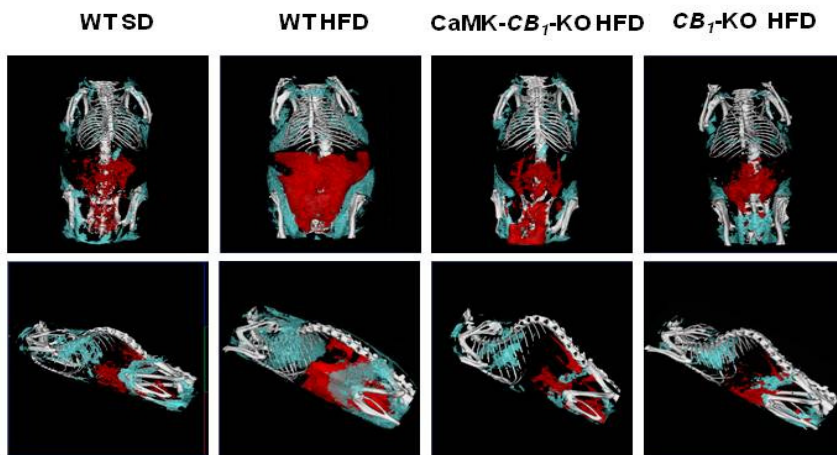
(D) Calcolo del cambiamento percentuale di peso (rispetto al peso iniziale) in animali alimentati con HFD e trattati giornalmente con rimonabant (10 mg/kg i.p.) per 32 giorni. (▲) CaMK-CBI-WT veicolo (n = 6), (▼) CaMK-CBI-KO veicolo (n = 5), (■) CaMK-CBI-WT rimonabant (n = 7), (●) CaMK-CBI-KO rimonabant (n = 6). #p < 0.0005 CaMK-CBI-WT rimonabant vs CaMK-CBI-WT veicolo, ***p < 0.0005 CaMK-CBI-WT rimonabant vs CaMK-CBI-KO rimonabant.

(E) Peso corporeo di topi CaMK-CBI-WT (▲) e CaMK-CBI-KO (▼) durante 12 settimane di somministrazione di dieta supergrassa (Super HFD). n = 5 per genotipo. I dati sono espressi come media ± SEM.

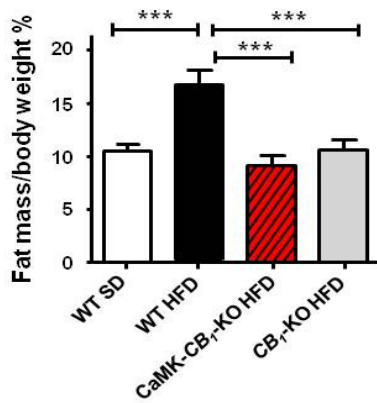
(F) Confronto tra guadagno percentuale di peso indotto dalla dieta HFD (barre bianche) e guadagno indotto dalla dieta superHFD (barre nere) in topi CaMK-CBI-WT e CaMK-CBI-KO. * p < 0.05, ***p < 0.0005.

Figura 8

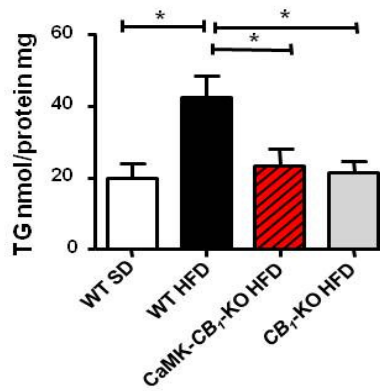
A



B



C



D

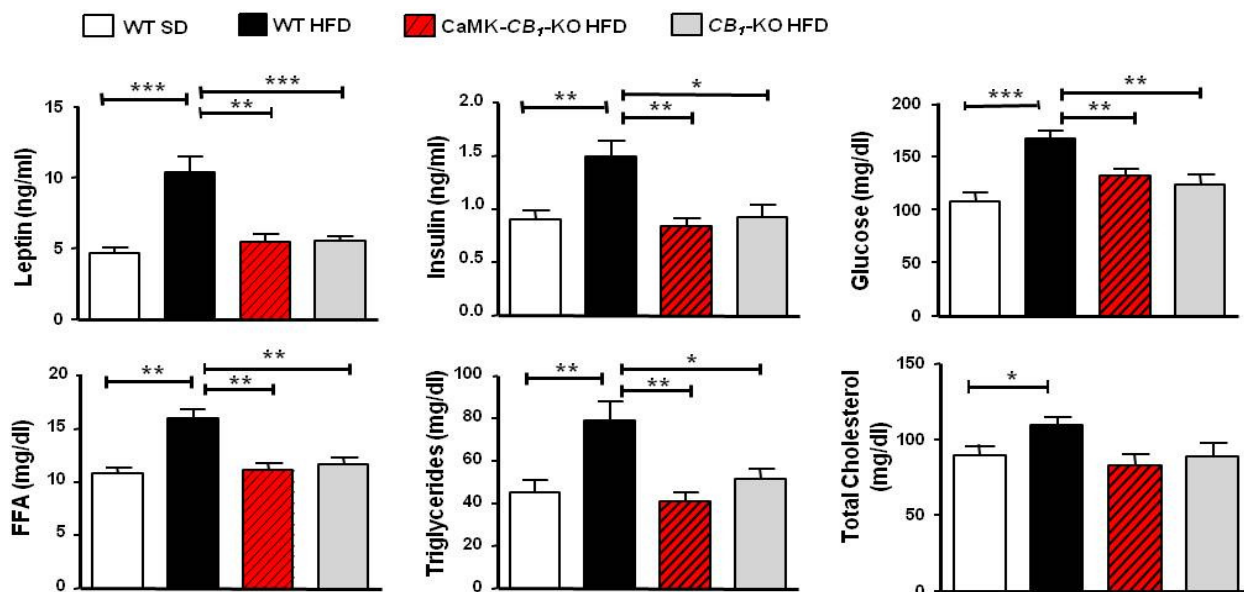


Figura 8: Caratterizzazione della massa grassa e del profilo metabolico in topi CB1 knockout alimentati con dieta grassa.

(A) Immagini microCT in cui è stato messo in evidenza (rendering tridimensionale) lo scheletro, il tessuto adiposo viscerale (in rosso) e il tessuto adiposo sottocutaneo (in blu). Le immagini sono rappresentative di un topo WT in dieta standard, (SD), un topo WT in dieta grassa (HFD), un topo CaMK-CB1-KO ed un topo CB1-KO in dieta grassa. I pannelli superiori rappresentano la visione frontale, quelli inferiori la visione laterale.

(B) Quantificazione del contenuto totale di tessuto adiposo (espresso in percentuale rispetto al peso corporeo) effettuata su immagini microCT di topi WT in SD (barra bianca, n=15), topi WT in HFD (barra nera, n=16), topi CaMK-CB1-KO in HFD (barra rossa tratteggiata, n=11), topi CB1-KO in HFD (barra grigia, n=13). ***p < 0.0005.

(C) Contenuto di trigliceridi epatici (TG) in topi WT alimentati con SD (barra bianca, n=7), topi WT in HFD (barra nera, n=6), topi CaMK-CB1-KO in HFD (barra rossa tratteggiata, n=8), topi CB1-KO in HFD (barra grigia, n=8). *p < 0.05.

(D) Profilo ormonale di topi WT alimentati con SD (barra bianca), topi WT in HFD (barra nera), topi CaMK-CB1-KO in HFD (barra rossa tratteggiata), topi CB1-KO in HFD (barra grigia). Il dosaggio di leptina, insulina e acidi grassi liberi (FFA) è stato effettuato su n=20 animali per genotipo e dieta. Il calcolo di trigliceridi, colesterolo totale e glucosio su n=12 per genotipo e dieta. ***p < 0.0005; **p < 0.005; *p < 0.05.

I dati presentati in B, C e D sono espressi come media \pm SEM. I valori ottenuti per i topi CaMK-CB1-WT e CB1-WT nella condizione di SD e di HFD sono stati cumulati in quanto non statisticamente diversi tra loro.

Figura 9

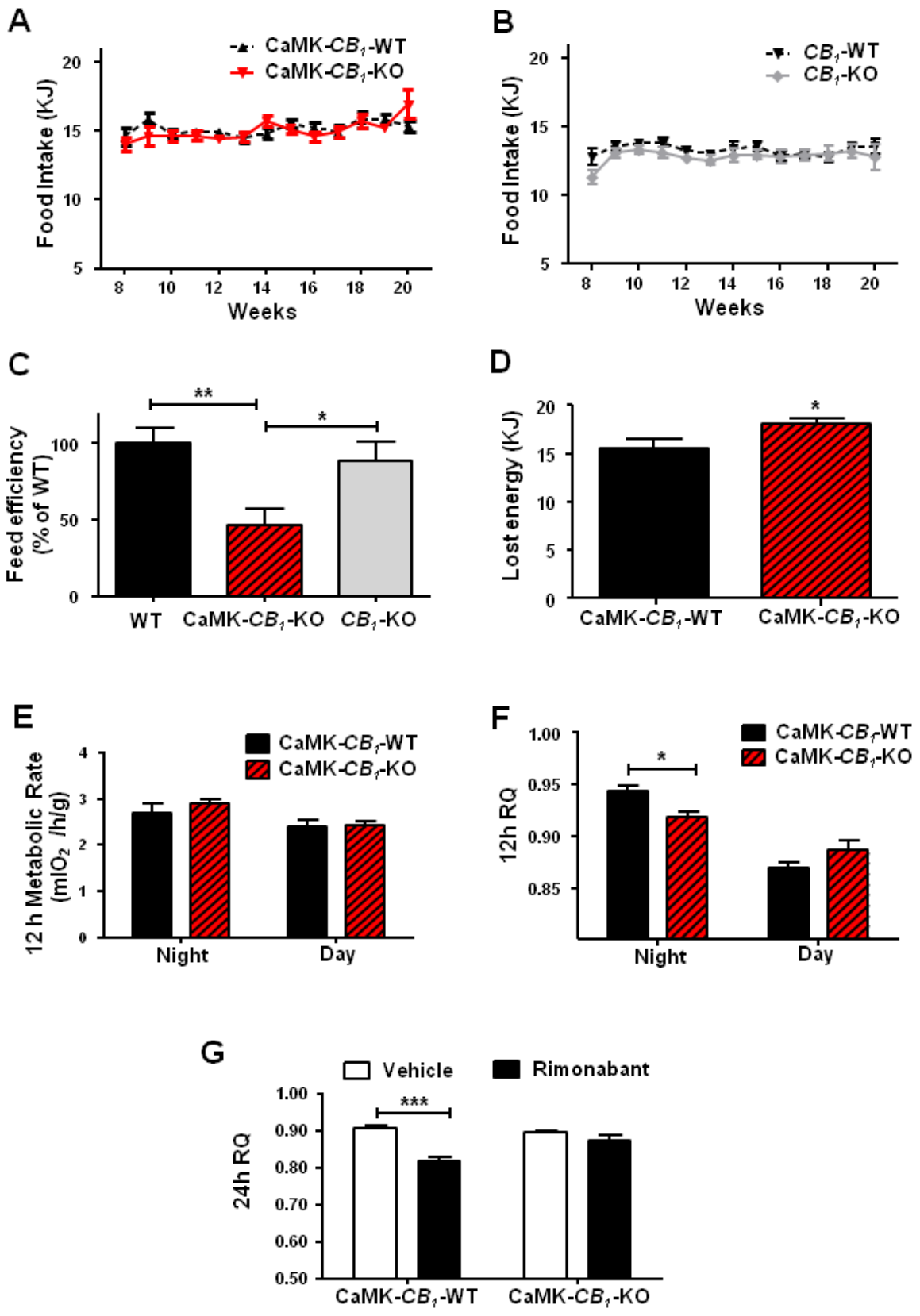


Figura 9: Omeostasi energetica in topi CaMK-CB1-KO in dieta grassa.

(A) Introito calorico settimanale in topi CaMK-CB1-WT (\blacktriangle) e CaMK-CB1-KO (\blacktriangledown) calcolato durante le 12 settimane di somministrazione di HFD (n = 24 per genotipo).

(B) Introito calorico settimanale in topi CaMK-CB1-WT (n = 25) (\blacktriangledown) e CaMK-CB1-KO (n = 20) (\blacklozenge) calcolato durante le 12 settimane di somministrazione di HFD.

(C) Feed efficiency in topi WT (barra nera), CaMK-CB1-KO (barra rossa tratteggiata) e CB1-KO (barra grigia) durante le 12 settimane di HFD (n = 20 per genotipo). *p < 0.05; **p < 0.005. I dati sono espressi come percentuale del WT \pm SEM. I valori ottenuti per i topi CaMK-CB1-WT e CB1-WT sono stati cumulati in quanto non statisticamente differenti tra loro.

(D) Perdita di energia giornaliera attraverso le feci (analizzata attraverso bomba calorimetrica) in topi CaMK-CB1-WT (n = 6, barra nera) e CaMK-CB1-KO (n = 7, barra rossa tratteggiata) alimentati con HFD.

(E) Rate metabolico durante la fase notturna (7.00 pm-7.00 am) e diurna (7.00 am-7.00 pm) in topi CaMK-CB1-WT (n = 5, barra nera) e CaMK-CB1-KO (n = 6, barra rossa tratteggiata) alimentati con HFD. *p < 0.05.

(F) Quoziente respiratorio medio (RQ) calcolato durante la fase notturna (7.00 pm-7.00 am) e diurna (7.00 am-7.00 pm) in topi CaMK-CB1-WT (n = 5, barra nera) e CaMK-CB1-KO (n = 6, barra rossa tratteggiata) alimentati con HFD. *p < 0.05.

(G) Quoziente respiratorio medio (RQ) calcolato ogni ora per 2 giorni consecutivi in topi CaMK-CB1-WT (n = 7) e CaMK-CB1-KO (n = 6) alimentati con HFD. Nel primo giorno, gli animali sono stati trattati con veicolo, all'inizio del secondo giorno gli stessi animali sono stati trattati con rimonabant (10 mg/kg i.p.). ***p < 0.0005. Barre bianche: animali trattati con veicolo, barre nere: animali trattati con rimonabant.

I dati presentati in A, B, D, E, F, G sono espressi come media \pm SEM.

Figura 10

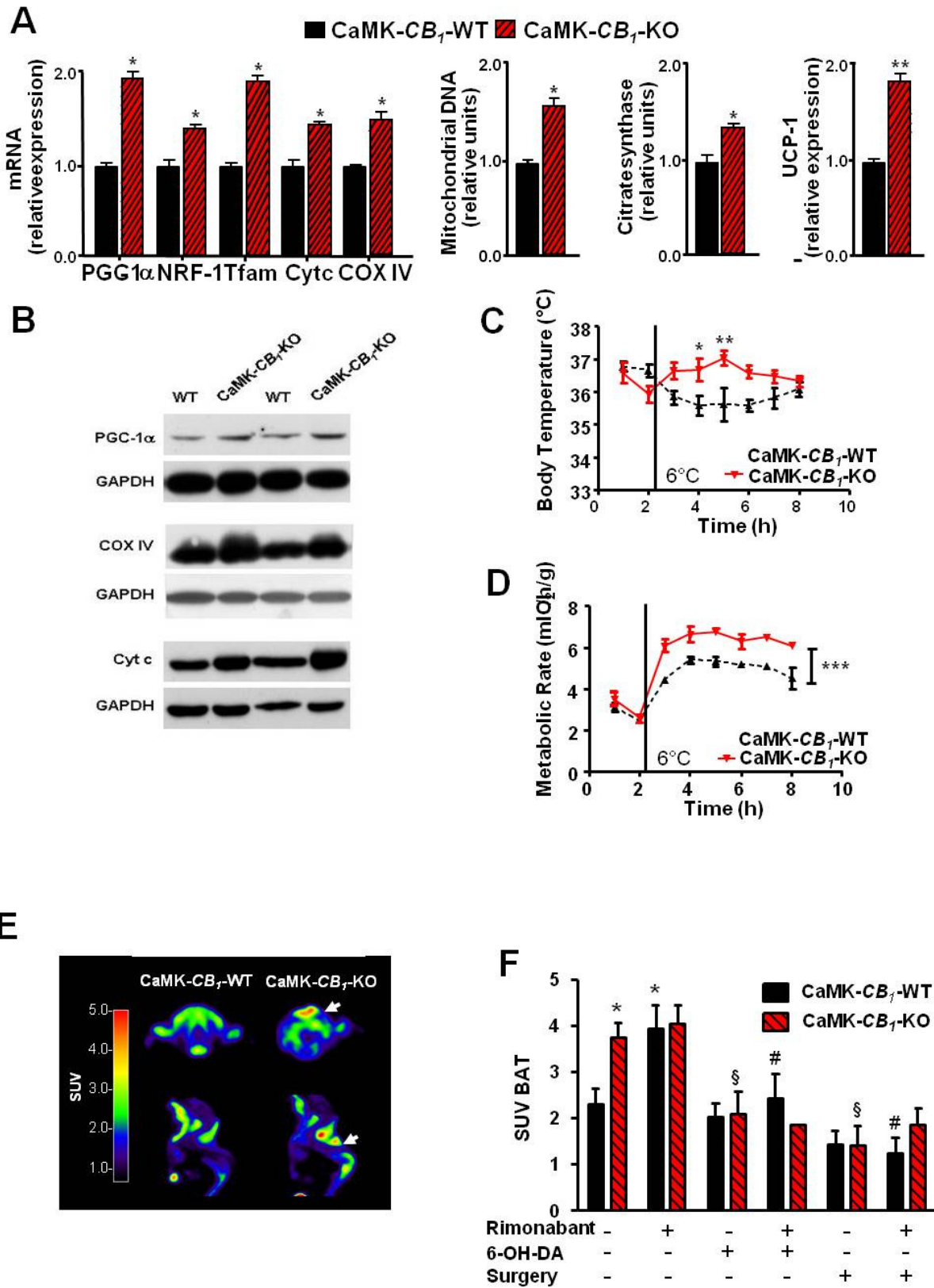


Figura 10: Valutazione della termogenesi e della funzionalità del BAT in topi CaMK-CBI-KO alimentati con dieta grassa.

(A) Analisi della biogenesi mitocondriale e dei livelli di mRNA di UCP-1 nel BAT di topi CaMK-CBI-WT (barre nere) e CaMK-CBI-KO (barre rosse tratteggiate) alimentati con HFD. I livelli di DNA mitocondriale e di mRNA per PGC-1 α , NRF-1, Tfam, COX IV e Cyt c sono stati analizzati con Real Time PCR. n = 7 per i topi CaMK-CBI-WT, n = 8 per i topi CaMK-CBI-KO. **p < 0.005 vs CaMK-CBI-WT.

(B) Analisi con Western Blot dell'espressione di PGC-1 α , Cyt c e COX IV nel BAT di topi CaMK-CBI-WT e CaMK-CBI-KO alimentati con HFD.

(C) Temperatura corporea durante esposizione al freddo (+6°C) per 6 ore, in topi CaMK-CBI-WT (\blacktriangle)(n = 5) e CaMK-CBI-KO (\blacktriangledown)(n = 6) alimentati con HFD. *p < 0.05, **p < 0.005

(D) Rate metabolico in topi CaMK-CBI-WT (\blacktriangle)(n = 5) e CaMK-CBI-KO (\blacktriangledown)(n = 6) alimentati con HFD durante 6 ore di esposizione al freddo +6°C. ***p < 0.0005.

(E) Immagine PET rappresentativa dell'uptake del tracciante ^{18}F -FDG nel BAT soprascapolare (freccia) di un topo CaMK-CBI-WT ed un topo CaMK-CBI-KO esposti a +6°C. I pannelli superiori rappresentano la visione assiale, i pannelli inferiori la visione sagittale.

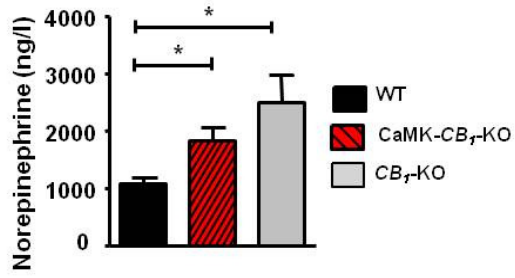
(F) Quantificazione dell'uptake di ^{18}F -FDG tramite il parametro SUV nel BAT soprascapolare di topi CaMK-CBI-WT (barra nera) e topi CaMK-CBI-KO (barra rossa tratteggiata), sottoposti ad esposizione a freddo e a diversi trattamenti sperimentali. Le varie corti di animali sono composte da: topi trattati con veicolo (n = 12 WT, n = 9 KO), veicolo + 6-OH-DA (n = 6 WT, n = 6 KO), veicolo + denervazione chirurgica (n = 6 WT, n = 6 KO).

L'esame PET/CT è stato ripetuto due volte sugli stessi animali, senza e con somministrazione di rimonabant (10 mg/kg i.p) rispettivamente. *p < 0.05 vs CaMK-CBI-WT veicolo, §p < 0.05 vs CaMK-CBI-KO veicolo, #p < 0.05 vs CaMK-CBI-WT rimonabant.

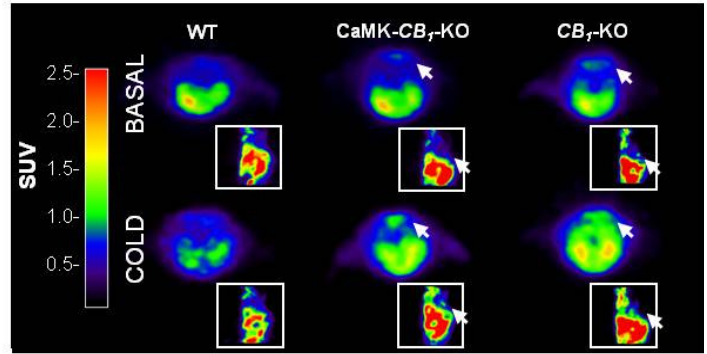
I dati presentati in A, C, D, F sono espressi come media \pm SEM.

Figura 11

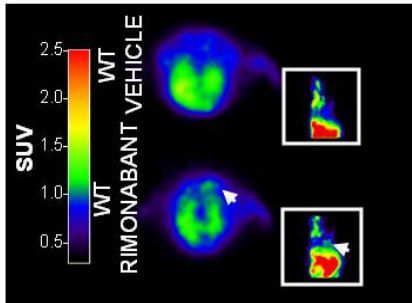
A



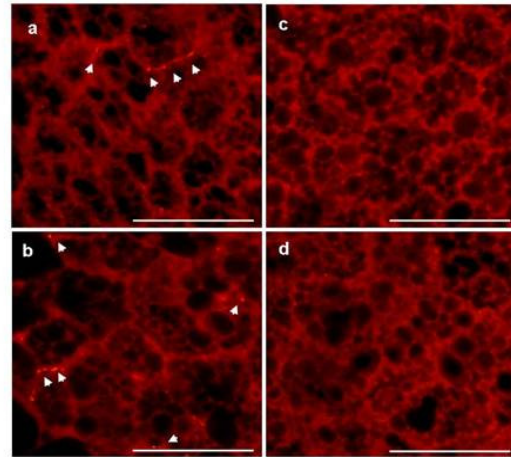
B



C



E



D

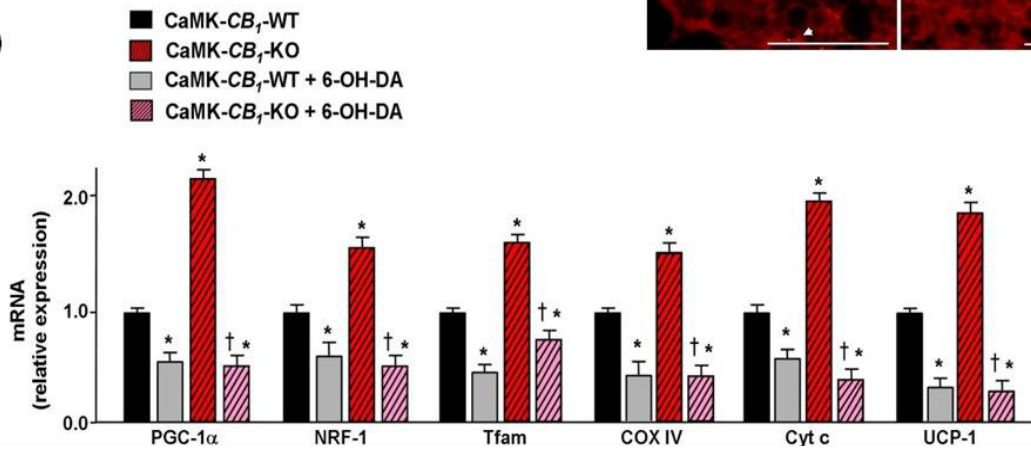


Figura 11: Ruolo svolto dal sistema nervoso simpatico nel regolare l'omeostasi energetica in topi knockout per il recettore CB1.

(A) Livelli plasmatici di noradrenalina in topi WT, (barra nera, n=12), topi CaMK-*CBI*-KO (barra rossa, n=7) e topi *CBI*-KO (barra grigia, n=9) alimentati con HFD. *p < 0.05 vs WT. I valori ottenuti per i topi CaMK-*CBI*-WT e *CBI*-WT sono stati cumulati in quanto non statisticamente diversi tra loro.

(B) Immagine PET rappresentativa dell'uptake del tracciante ¹¹C-metadrossiefedrina nel BAT (freccia) di topi WT (n = 4), CaMK-*CBI*-KO (n = 4), e *CBI*-KO (n=3) analizzati in condizioni basali e in seguito ad esposizione al freddo.

(C) Immagine PET rappresentativa dell'uptake del tracciante ¹¹C-metadrossiefedrina analizzato a temperatura ambiente nel BAT (freccia) di topi WT trattati cronicamente con veicolo o rimonabant (10mg/kg), per 32 giorni.

(D) Analisi dell'effetto della simpatectomia chimica (6-OH-DA iniettata alla concentrazione di 80 mg/kg) sulla biogenesi mitocondriale e sull'espressione dell'mRNA di UCP-1 nel BAT di topi CaMK-*CBI*-WT e CaMK-*CBI*-KO analizzati dopo esposizione al freddo (+ 6 °C). n = 5 CaMK-*CBI*-WT, n = 5 CaMK-*CBI*-KO, n = 4 CaMK-*CBI*-WT + 6-OH-DA, n = 4 CaMK-*CBI*-KO + 6-OH-DA. * p < 0.05 vs CaMK-*CBI*-WT, † p < 0.05 vs CaMK-*CBI*-KO.

(E) Immunoreattività della tirosina idrossilasi analizzata con immunofluorescenza nel BAT di topi trattati con una soluzione veicolo (controllo per la simpatectomia con 6-OH-DA) (a), topi di controllo operatorio (controllo per la procedura di denervazione chirurgica) (b), topi denervati attraverso 6-OH-DA (c), topi denervati chirurgicamente (d). Le frecce indicano le fibre adrenergiche. Scale bar=200 μm.

I dati presentati in A e D sono espressi come media ± SEM. L'attività radioattiva visualizzata in B e C è espressa con il parametro SUV, i riquadri all'interno delle immagini B e C rappresentano la visione sagittale dell'immagine PET.

Figura 12

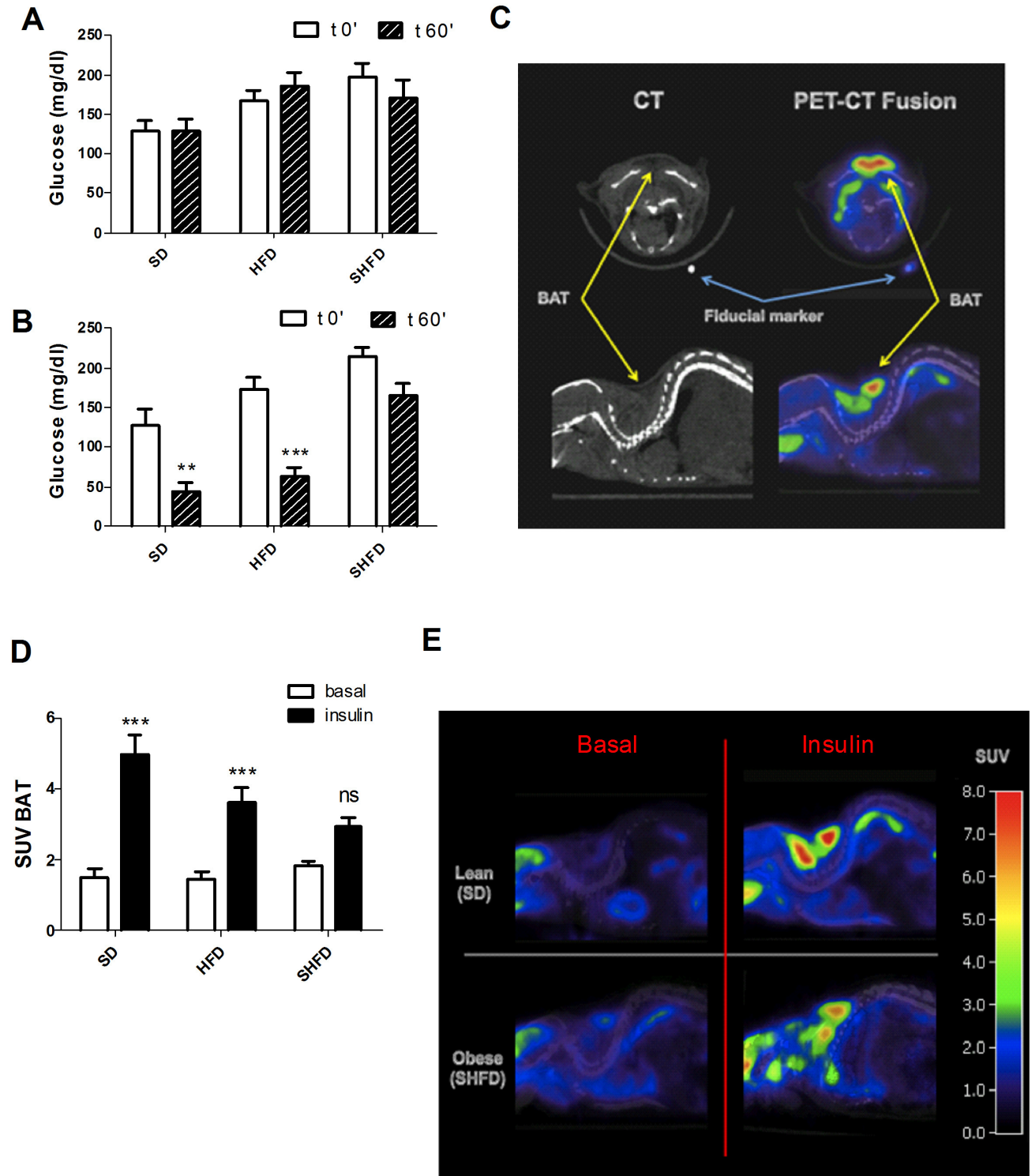


Figura 12: Valutazione della sensibilità insulinica nel BAT di animali magri e obesi con PET/CT imaging.

(A) Analisi del contenuto di glucosio totale calcolato (tramite glucometro) durante la procedura PET/CT basale (trattamento degli animali con soluzione veicolo), nell'istante t_0' (immediatamente prima dell'iniezione del tracciante) e nell'istante t_{60}' (60 minuti dopo, cioè al termine della fase di biodistribuzione e di uptake del tracciante). SD= standard diet (n = 7), HFD= high fat diet (n = 8), SHFD= super high fat diet (n = 7). I dati sono espressi come media \pm SEM.

(B) Analisi ripetuta come in A, durante la procedura PET/CT effettuata negli stessi animali in presenza di stimolo insulinico. L'insulina (0.7 U/kg i.p.) è stata iniettata immediatamente dopo l'iniezione del tracciante. ***p < 0.0005 vs t_0' , **p < 0.005 vs t_0' .

(C) Rappresentazione della procedura di fusione PET/CT. Attraverso una procedura via software, dei riferimenti anatomici localizzati sul lettino di analisi permettono di sovrapporre nello spazio l'immagine PET con l'immagine CT. In questo modo si ottiene la localizzazione anatomica delle aree metabolicamente attive visibili nell'immagine PET.

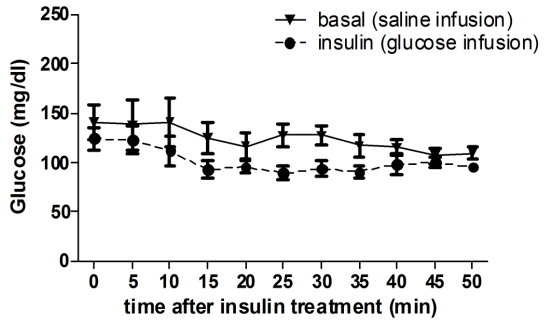
(D) Analisi SUV dell'uptake di ^{18}F -FDG nel BAT di topi in SD (n=9), HFD (n=9) e SHFD (n=6) analizzati durante la procedura PET/CT basale (trattamento con veicolo, barre bianche) o in seguito a stimolo insulinico (0,7 U/kg, barre nere). ***p < 0.0005 vs condizione basale.

(E) Immagine PET/CT rappresentativa dell'uptake di ^{18}F -FDG nel BAT di un topo magro (SD, pannello superiore) ed obeso (SHFD, pannello inferiore) analizzati in condizioni basali ed in seguito a stimolo insulinico.

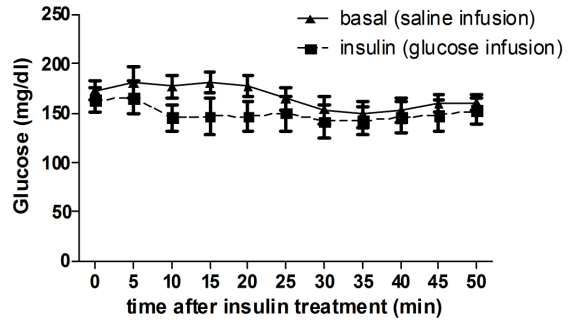
I dati presentati in A, B, C e D sono espressi come media \pm SEM e analizzati attraverso 2 way ANOVA ripetuto con il post test Bonferroni.

Figura 13

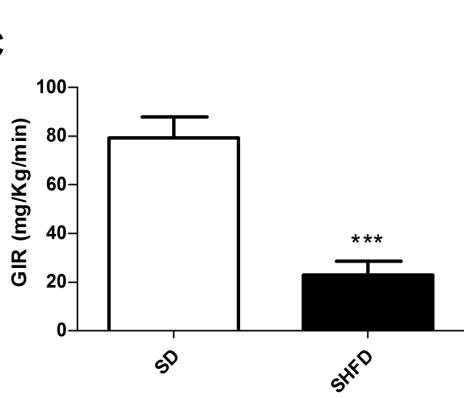
A



B



C



D

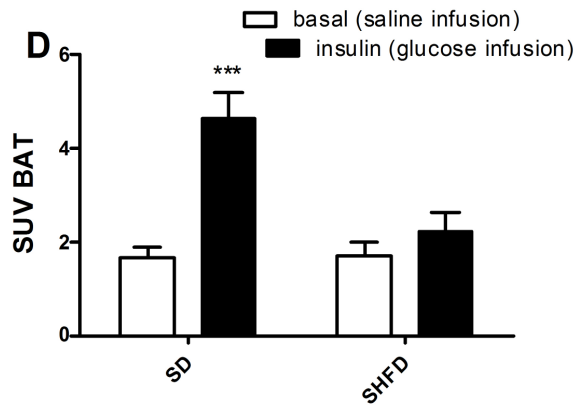


Figura 13: Valutazione della sensibilità insulinica nel BAT tramite PET/CT imaging in condizioni di euglicemia.

(A) Andamento del glucosio totale in animali SD (n=6) calcolato durante la procedura PET/CT, effettuata infondendo soluzione salina, oppure glucosio esogeno (in seguito al trattamento con insulina) al fine di mantenere la condizione di euglicemia.

(B) Andamento del glucosio totale in animali SHFD (n=7) calcolato durante la procedura PET/CT, effettuata infondendo soluzione salina, oppure glucosio esogeno (in seguito al trattamento con insulina) al fine di mantenere la condizione di euglicemia.

(C) Rate di infusione del glucosio esogeno (GIR) necessario per mantenere la condizione di euglicemia in animali SD (barra bianca, n=6) e animali SHFD (barra nera, n=7). ***p < 0.0005.

(D) Analisi SUV dell'uptake di ¹⁸F-FDG nel BAT di topi in SD (n=6) e SHFD (n=7) analizzati durante la procedura PET/CT basale (trattamento con veicolo, barre bianche) o durante la procedura con stimolo insulinico (0,7 U/kg di trattamento con insulina e successivobilanciamento con infusione di glucosio esogeno, barre nere). ***p < 0.0005 vs condizione basale.

I dati presentati in A, B, C e D sono espressi come media ± SEM. I dati in A, B e D analizzati attraverso 2 way ANOVA ripetuto con Bonferroni post test. In C è stato effettuato t-test di student.