

**UNIVERSITA' DELLA CALABRIA**

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

**CORSO DI DOTTORATO**

Scienze della Vita

**CICLO**

XXX

**Effetti del daidzein sul comportamento mnemonico  
attraverso le variazioni del sistema neurotensinergico e di  
fattori infiammatori in aree limbiche di criceti *high fat diet***

**Settore Scientifico Disciplinare BIO/06**

**Coordinatore:** Ch.ma Prof. Maria Carmela Cerra

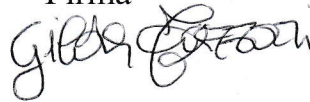
Firma 

**Supervisore/Tutor:** Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Firma 

**Dottoranda:** Dott.ssa Gilda Fazzari

Firma



# Indice

Riassunto.....	3
Abstract.....	6
Introduzione .....	8
Capitolo I .....	13
I.1 Obesità e alterazioni fisiologiche.....	15
I.2 Ruolo del SNC nella regolazione del <i>feeding behavior</i> .....	17
I.2.1 Patogenesi dell'obesità e sistemi neuronali coinvolti .....	24
I.3 Obesità e Infiammazione .....	27
I.4 Patologie associate all'obesità .....	31
I.4.1 Disturbi cognitivi associati all'obesità .....	34
I.4.2 Disturbi comportamentali e obesità .....	36
I.5 Aspetti clinici dell'obesità .....	38
I.6 Nuovi approcci terapeutici nella cura dell'obesità: le sostanze naturali.....	40
I.6.1 Daidzein .....	43
I.6.1.1 Recettori dei fitoestrogeni e il loro meccanismo d'azione .....	45
I.6.2 Effetti del DZ nel SNC.....	48
Capitolo II.....	51
II.1 Il sistema NTergico .....	52
II.1.1 Recettori per la NT .....	54
II.1.2 Meccanismo d'azione dei recettori NTergici.....	57
II.1.3 Localizzazione della NT e dei relativi recettori nel SNC .....	59
II.1.4 Effetti del sistema NTergico sui disordini metabolici .....	60
II.1.5 NT e infiammazione .....	62
II.1.6 NT e disturbi comportamentali.....	63
II.1.7 NT e disturbi cognitivi.....	65
Capitolo III.....	68
III.1 Modello sperimentale.....	69
III.1.1 Criceto Dorato ( <i>Mesocricetus auratus</i> ).....	69
III.1.2 Biologia .....	71
III.2 Validità del modello sperimentale .....	73

III.3 Procedura sperimentale .....	74
III.3.1 Analisi comportamentale.....	75
III.3.1.1 <i>Elevated plus maze test</i> .....	76
III.3.1.2 <i>Novel object recognition test</i> .....	77
III.3.1.3 <i>Conditioned place preference test</i> .....	80
III.4 Prelievo ed Analisi Ematiche .....	81
III.5 Analisi neurodegenerativa mediante <i>Amino Cupric Silver Stain (ACS)</i> .....	82
III.6 <i>Western blotting</i> .....	83
III.7 Analisi statistica .....	84
Capitolo IV.....	85
IV.1 Effetti di HFD sul <i>feeding/drinking e home cage behaviors</i> .....	86
IV.1.2 Effetti della HFD sull'induzione di <i>anxiety-like behaviors</i> .....	89
IV.1.3 Effetti di HFD sulle funzionalità cognitive .....	90
IV.2 Effetti del DZ sul <i>feeding/drinking e home-cage performances</i> in criceti HFD.....	92
IV.2.1 Effetti del DZ sugli <i>anxiety-like behaviors</i> .....	95
IV.3 Effetti del DZ sulle alterazioni cognitive indotte dalla HFD.....	98
IV.4 Analisi ematiche: effetto del DZ sul profilo lipidico e glicemico .....	99
IV.4.1 Effetto del DZ sui parametri tissutali .....	102
IV.5 Effetti neurodegenerativi dell'HFD e neuroprotettivi del DZ .....	104
IV.6 Effetti della HFD sull'espressione di NTR1 .....	107
IV.7 Effetti del DZ sull'espressione di NTR1 .....	109
IV.8 Effetti del DZ sull'espressione di IL-10 .....	112
Discussione .....	116
Bibliografia .....	124
Abbreviazioni.....	154

# RIASSUNTO

In questi ultimi anni è emerso che le diete stanno sempre di più condizionando il nostro stato fisico-sociale come indicato dagli alimenti a base di grassi che nonostante siano ampiamente gratificanti, inducono alterazioni marcate in quelle regioni cerebrali specifiche per il controllo dei comportamenti psichico-cognitivi e soprattutto sugli aspetti nutrizionali. Il consumo di cibo e i meccanismi d'azione implicati nell'omeostasi energetica fanno parte di un circuito neuronale complesso che, quando alterato, porta ad un aumento del peso corporeo e conseguentemente lo sviluppo di obesità, ritenuta una malattia cronica e di conseguenza responsabile dello sviluppo di varie co-morbilità mediche come malattie cardiovascolari (soprattutto ipertensione), dislipidemia, e diabete di tipo 2. Tali effetti, oltre ad evitare l'uso di farmaci con troppi effetti collaterali, hanno indotto ad una maggiore attenzione verso la produzione di molecole considerate "più sicure" a base di estratti naturali come il daidzein (DZ), un isoflavone glicosidico capace di promuovere effetti estrogenici a livello del sistema nervoso centrale (SNC). Tale fitoestrogeno ha fornito delle azioni neuroprotettive contro l'aumento del peso corporeo, contro lunghi periodi di *feeding* e ridotte attività esplorative dei criceti (*Mesocricetus auratus*) esposti ad un'elevata dieta ad alto contenuto di grassi (HFD). Questo isoflavone non solo ha ridotto il comportamento *anxiety-like* in animali iperlipidici come suggerito da un maggior tempo di permanenza ( $p < 0.01$ ) nei bracci aperti dell'*elevated plus maze* (EPM) ma ha anche favorito maggiori intervalli ( $p < 0.001$ ) di esplorazione verso nuovi oggetti quando esposti al *novel object recognition* (NOR) test. Da un punto di vista molecolare, DZ è in grado di esercitare una consistente protezione, al cervello, contro eventi neurodegenerativi come indicato dai pochi granuli di *Amino Cupric Silver Stain* nell'ippocampo (HIP), nell'ipotalamo (HTH) e nell'amigdala (AMY) molto probabilmente attraverso una ridotta interazione del recettore neurotensina 1 (peptide anoressigenico; NTR1) con quello GABAergico-leptina nelle ultime due aree durante il *conditioned place preference* (CPP) test. Contestualmente il recupero delle *performances* cognitive sembra essere legato a bassi livelli di NTR1 ( $p < 0.001$ ) in maniera ER $\beta$ -dipendente durante il NOR test. In aggiunta, gli effetti del DZ sono stati potenziati da un'elevata capacità trascrizionale della citochina antinfiammatoria IL-10 la quale mediante la riduzione dell'adenosina 5'-monofosfato chinasi (AMPK) e della chinasi regolata da segnali extracellulare (ERK) ha fortemente migliorato i comportamenti cognitivi oltre a quelli esplorativi. Pertanto, questi primi risultati forniscono importanti evidenze degli effetti neuroprotettivi del DZ in criceti iperlipidemici attraverso proprietà di ripristino dell'NTR1 e IL-10, non solo nelle aree sopracitate ma anche in centri encefalici specifici per il controllo delle funzioni di *feeding* e delle

attività cognitive ed endocrine che costituiscono, senz'altro forti basi per l'introduzione di nuove applicazioni terapeutiche contro le condizioni di obesità.

# ABSTRACT

In the past years, growing indications have pointed to food diets as major factors capable of conditioning physical-social states in humans as suggested by high-fat containing food sources which, despite their extremely "tasteful" properties, are responsible for marked morpho-structural alterations in critical brain areas for the regulation of not only psycho-cognitive behaviors but above all for nutritional parameters. It is already known that food consumption and action mechanisms implicated in energetic homeostasis are part of a complex neuronal circuit that when they are altered tend to account for increased body weight and consequently the development of obesity, regarded a chronic disease leading to different medical co-morbidities such as cardiovascular diseases (especially hypertension), dyslipidemia and diabetes type 2. From these effects plus the avoidance of applying drugs with numerous collateral alterations have directed a greater attention towards the production of "safer" drugs natural deriving vegetable extracts such as daidzein (DZ), a glucosidic isoflavone capable of mimicking estrogenic activities at the brain level, which supplied neuroprotective values against increased body weight, elevated feeding duration and diminished locomotor activity of high fat diet (HFD) hamsters (*Mesocricetus auratus*). This isoflavone also reduced anxiety-like behaviors in hyperlipidic animals as indicated by a greater time spent ( $p < 0.01$ ) in open arms of elevated plus maze (EPM) along with greater exploration ( $p < 0.001$ ) tendencies toward new objects of the novel object recognition (NOR) test. From a molecular point of view, DZ greatly protected the brain against neurodegeneration events as pointed out by few Amino Cupric Silver Stain granules in the hippocampus (HIP), hypothalamus (HTH) and amygdala (AMY) very likely via a diminished interaction of neurotensin receptor1 (anorexic neuropeptide; NTR1) GABAergic-leptin receptor levels in the latter two areas after the conditioned place preference (CPP) test. Contextually the recovered cognitive performances seemed to be tightly linked with reduced NTR1 expression levels in an ER $\beta$  manner for HIP after NOR test. In addition, such effects of DZ also strongly required increased levels of the anti-neuroinflammatory cytokine IL-10 that by reducing adenosine 5' monophosphate kinase (AMPK) and extracellular receptor kinase (ERK) widely improved cognitive together with exploratory behaviors. Overall, these first results supply important evidences on the neuroprotective values of DZ, which through NTR1 + IL-10 protective and repairing mechanisms of, aside the above limbic areas, also appetite-mediated brain centers known for their feeding, cognitive and endocrine functions, may surely comprise a good start for the introduction of novel therapeutic applications against obesity conditions.



# INTRODUZIONE

Il corretto funzionamento del Sistema Nervoso Centrale (SNC) richiede un elevato e continuo consumo di energia da cui dipende il controllo delle scelte alimentari e di conseguenza il miglioramento della qualità della vita e del benessere psicofisico dell'individuo. Sebbene assumere quotidianamente una maggiore quantità di cibo è stato, da un punto di vista evolutivo, necessario per sostenere la spesa energetica, l'abilità di sviluppare riserve energetiche sotto forma di deposito di grasso è diventata, attualmente, un problema di salute per gran parte della popolazione obesa (Berthoud and Morrison, 2016). Numerose sono le evidenze a sostegno dell'ipotesi che l'incremento del peso corporeo e di conseguenza l'obesità, correlati ad una dieta squilibrata o eccessiva e da una diffusa sedentarietà, influiscono negativamente sulle *performances* cerebrali suscitando il continuo interesse della ricerca scientifica nel mettere in luce i complessi meccanismi neurobiologici e psicosociali alla base della regolazione dell'appetito e del comportamento alimentare (Chau et al., 2013; Lacroix et al., 2015; Kumar and Kelley, 2017). Tali disordini metabolici sono spesso associati non solo alle malattie cardiovascolari, alla sindrome metabolica, al diabete mellito di tipo 2 e ad alcune forme tumorali (Weiss et al., 2004; Despres and Lemieux, 2006; Kahn et al., 2006; Apovian and Gokce, 2012) ma anche a disturbi neuropsichiatrici come ad esempio l'ansia, l'attacco di panico, le malattie da stress post-traumatico e le disfunzioni cognitive (de Noronha et al., 2016).

Negli ultimi anni, è stato dimostrato come diete ricche di acidi grassi saturi e di zuccheri raffinati rappresentino una delle principali cause di alterazioni mnemoniche in un individuo sano. Queste alterazioni sono principalmente legate alla disfunzione di centri encefalici chiave che attraverso l'interazione di complessi sistemi di segnali centrali e periferici e insieme a fattori psicologici e sociali risultano essere in grado di controllare significativamente l'omeostasi energetica, il *feeding*, la risposta allo stress e soprattutto l'apprendimento e la funzionalità cognitiva (Gibson et al., 2010). In tale contesto, studi condotti su topi e ratti "*diet-induced obesity*" (DIO), modelli sperimentali che non presentano mutazioni genetiche, ma sono semplicemente esposti ad un'alimentazione ad alto contenuto energetico che determina lo sviluppo di obesità, hanno mostrato un'alterata *working memory* e disordini di apprendimento (Jurdak et al., 2008; Murray et al., 2009) associati a ridotte *performances* cognitive (Kanoski and Davidson, 2010; Kosari et al., 2012; Wang et al., 2016). Parallelamente, recenti analisi hanno rilevato come l'eccesso di peso in individui di età media e negli anziani, causa una maggiore predisposizione all'insorgenza di disturbi neurologici, come il morbo di Alzheimer (AD), e un precoce declino cognitivo (Dominic and Westbrook, 2016), mentre nel periodo adolescenziale l'assunzione prolungata di cibi iperlipidici è,

non solo negativamente correlata ad una diminuzione dell'attività mnemonica e della capacità di apprendimento (Nyaradi et al., 2014) ma anche ad una minore performance scolastica in particolar modo nella capacità di ragionamento e calcolo (Overby et al., 2013). Gli individui sani possono, inoltre, manifestare un abbassamento dei livelli di concentrazione e della velocità di recupero anche dopo una breve esposizione a tale dieta (Edwards et al., 2011; Holloway et al., 2011).

Sulla base di queste condizioni compromesse, una crescente attenzione è stata diretta verso l'utilizzo di sostanze naturali in grado di ridurre le alterazioni indotte dalle condizioni di obesità e nello stesso tempo evitare effetti collaterali in modo da sostituire terapie farmacologiche convenzionali. Una prima linea di ricerca si era focalizzata sull'adozione di un piano alimentare come strategia preventiva contro i disordini metabolici associati all'ansia e ai deficit cognitivi. Difatti, molte terapie per il trattamento dell'obesità sono basate non soltanto su modifiche dello stile di vita, del comportamento, della dieta e sull'aumento dell'attività fisica ma anche sull'utilizzo di farmaci in grado di contrastare l'eccesso di grasso o intervenendo chirurgicamente nelle situazioni ad alto rischio di mortalità (Alamuddin et al., 2016; Garvey et al., 2016; Gadde and Pritham, 2017). Tuttavia, la quasi totalità di queste molecole è ancora in fase di sperimentazione e molti pazienti manifestano resistenza nei confronti di tali strategie farmacologiche a causa della loro limitata efficacia e dei numerosi effetti collaterali. A causa di queste limitazioni si è assistito, negli ultimi anni, ad un crescente interesse verso la ricerca di rimedi naturali che si sono dimostrati un ottimo strumento terapeutico non farmacologico, in grado di migliorare la qualità della vita dei pazienti obesi. In particolare, i composti fitochimici presenti nella matrice degli alimenti di origine vegetale hanno mostrato un'azione neuroprotettiva dovuta soprattutto alla loro azione antiossidante (Martin., 2014). Tra questi, i polifenoli hanno mostrato effetti benefici in diverse patologie tra cui le malattie neurodegenerative (Li et al., 2014), l'ipertensione (Larson et al., 2012), le patologie cardiovascolari (Quinones et al., 2013), il cancro (Fresco et al., 2010; Martin et al., 2013), i processi infiammatori (Conte et al., 2015) e negli ultimi anni anche nei disordini metabolici come il diabete (Babu et al., 2013), la dislipidemia (Islam et al., 2015) e l'obesità. Numerosi studi hanno dimostrato, che la somministrazione di fitoestrogeni con la dieta diminuisce l'assunzione di cibo nei ratti, sviluppando anoressia attraverso sia la soppressione di agenti oreogigenici come il neuropeptide Y (NPY) e la galanina sia l'aumento di quelli anoressigenici quale l'ormone del rilascio della corticotropina (CRH) nell'ipotalamo (HTH). Altri studi condotti su topi obesi alimentati con una *high fat diet* (HFD) hanno evidenziato come la somministrazione di una miscela di isoflavoni, quali il daidzein (DZ) e la glicitina, abbia influito positivamente sulla salute dei

modelli sperimentali portando ad una significativa riduzione del loro peso corporeo e del tessuto adiposo (Rivera et al., 2013; Nishimura et al., 2017). Tali effetti sembrano essere modulati dalla capacità dei flavonoidi di agire sui meccanismi molecolari mediante l'interazione con i sistemi neurorecettoriali come ad esempio gli effetti benefici del fitoestrogeno cumestrololo sui centri barorecettoriali del tronco encefalico mediati sinergicamente con l'ossido nitrico (Liu et al., 2016). La genisteina ha mostrato un forte ruolo sullo sviluppo sia dell'ossido nitrico che del sistema vasopressinergico (Ponti et al., 2017). In questo stesso contesto, altri sistemi neuronali come la via NTErgica hanno mostrato di esercitare un ruolo predominante sui disordini metabolici e infiammatori (Carraway et al., 2007; Feng et al., 2015; Theoharides, 2017) e quindi potrebbero risultare un bersaglio chiave per gli effetti dei fitoestrogeni come il DZ (Subedi et al., 2017).

La neurotensina (NT), un tridecapeptide largamente distribuito nel cervello, esercita un'ampia gamma di effetti biologici come la modulazione della neurotrasmissione della dopamina (DA), l'ipotermia, l'antinocicezione e le sue implicazioni nel morbo di Parkinson (PD) e nella schizofrenia (White et al., 2012). Le azioni di tale molecola sono mediate attraverso tre noti recettori NT (NTR1, 2 e 3 / sortilin, Li et al., 2016) che sono densamente localizzati in aree che controllano stati emotivi come l'amigdala (AMY), nei processi cognitivi come l'ippocampo (HIP), e nel controllo del *feeding* come l'HTH. Tra i differenti sottotipi di recettori, l'NTR1 è noto per mediare effetti anoressigenici della leptina cerebrale. In particolare, l'espressione della NT viene fortemente ridotta in modelli animali privi del recettore della leptina, e di conseguenza tendono a manifestare delle disfunzioni strettamente legate all'obesità (Levitas-Djerbi et al., 2015). La somministrazione di agonisti o antagonisti dell'NTR1 sembrano, inoltre, modificare i processi cognitivi e di apprendimento, nel primo caso migliorando le abilità mnemoniche (Lászlò et al., 2009; Xiao et al., 2014), mentre nel secondo caso alterandone la funzionalità (Santiago-Tirado et al., 2006). Alla luce di tali premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di andare a valutare da una parte gli effetti neuro-comportamentali indotti dal DZ nel criceto (*Mesocricetus auratus*), esposto ad una prolungata HFD, in particolare sul "*feeding behavior*", sull'attività motoria, sull'ansia e sul processo mnemonico, dall'altra correlare il ruolo protettivo di tale isoflavone sulle abilità mnemoniche, locomotorie e sull'omeostasi energetica mediante l'espressione di NTR1 e di fattori anti-infiammatori come l'interleuchina-10 (IL-10). Nella prima fase del lavoro sperimentale, i criceti, considerati eccellenti modelli di dislipidemia e più in generale di sindrome metabolica (Dillard et al., 2010), sono stati sottoposti ad un trattamento con HFD per 12 settimane e osservati periodicamente al fine di valutare gli effetti indotti da una tale dieta. In particolare sono stati rilevati

parametri come la quantità di cibo e acqua assunti, l'attività locomotoria e le variazioni di peso corporeo. Alla fine del trattamento, gli animali sono stati esposti al *Novel Object Recognition* (NOR) test, al *Conditioned Place Preference* (CPP) test e all'*Elevated plus-maze* (EPM), tre diversi paradigmi comportamentali utilizzati per valutare le alterazioni neuro-comportamentali indotte dall'HFD. I primi due test sono specifici per la valutazione delle abilità cognitive e in particolare il riconoscimento di nuovi oggetti o eventi gratificanti. L'EPM, invece è un test per la valutazione di stati ansiolitici e/o ansiogenici degli animali esposti a tale dieta. Nella seconda fase l'attenzione è stata rivolta alla capacità del DZ di attenuare le alterazioni neurocomportamentali indotte da HFD. In questo caso, l'isoflavone è stato aggiunto alla HFD e alla dieta standard per un massimo di 30 giorni. Successivamente, gli animali che hanno ricevuto le diete a base dell'isoflavone sono stati sottoposti alle stesse valutazioni comportamentali. Dal momento che le alterazioni neurocomportamentali sono spesso correlate a variazioni morfostrutturali, l'analisi comportamentale è stata associata ad un'indagine neurodegenerativa, mediante colorazione istologica quale l'*Amino Cupric Silver Stain* (ACS), per valutare da un lato il grado di neurodegenerazione indotto dalla HFD e dall'altro il ruolo protettivo del DZ a carico dei neuroni. Parallelamente è stata quantificata, mediante *western blotting*, l'espressione di NTR1 e di IL-10 al fine di comprendere l'azione a livello cerebrale di tali fattori su aree correlate a fenomeni di alterazioni dell'omeostasi energetica come l'HTH, ai processi mnemonici-cognitivi, quali l'HIP e alle condizioni di stress come l'AMY. Si è proceduto, infine, al prelievo di campioni tissutali ed ematici, nei diversi trattamenti, per la rilevazione di *markers* come colesterolo, trigliceridi e glucosio ematico al fine di individuare la presenza di una condizione di disfunzione metabolica indotta dalla dieta iperlipidica e l'azione di recupero da parte del DZ sul profilo lipoproteico e glicemico. Siamo ancora all'inizio ma i dati di questo studio, e in modo particolare l'azione neuroprotettiva del DZ sulle alterazioni comportamentali indotte dal HFD mediante i differenziati livelli di espressione encefalica di NTR1, nonché dei fattori infiammatori, potrebbero fornire utili indicazioni sugli intimi meccanismi neuronali modulati da tale fitoestrogeno e sviluppare nuovi target terapeutici utili per la cura dell'obesità soprattutto nei pazienti con disordini neurodegenerativi.

# CAPITOLO I

L'eccesso di adiposità, essere in sovrappeso o obeso, è un problema di salute pubblica globale in rapida crescita che provoca 2,8 milioni di morti all'anno ed è diventata la quinta causa principale di morte prematura. Il sovrappeso è il più comune disturbo nutrizionale nel mondo occidentale associato a specifiche malattie metaboliche croniche quali ipertensione, diabete mellito non dipendente da insulina (NIDDM) e ipercolesterolemia oltre a ictus, apnea del sonno, malattie dell'articolazione e alcuni tipi di tumori (Fred-Jiménez et al., 2016). Allo stesso tempo, l'obesità è diventata un'epidemia in sé, in quanto si tratta di una malattia multifattoriale che deriva da una complessa interazione tra metabolismo energetico ed ambienti sempre più "ostili" (fisico e sensoriale), con una crescente varietà di cibi molto gradevoli e un ridotto livello di attività fisica, passando attraverso non solo predisposizioni genetiche, ma anche attraverso aspetti ormonali, metabolici e comportamentali. Negli ultimi anni, infatti, le cattive abitudini alimentari, di adulti in sovrappeso di età superiore ai 20 anni, sono salite a circa 1,5 miliardi ed a questi vengono aggiunti 500 milioni di obesi, con numeri in continua crescita. Negli Stati Uniti, più di due terzi degli adulti sono in sovrappeso e metà di questi sono obesi. Livelli simili sono evidenti non solo in molti altri paesi sviluppati come l'Australia, il Regno Unito e il Canada (Finucane et al., 2011) ma anche nei paesi in via di sviluppo. In questi anni sta diventando, sempre di più, una prerogativa pubblica stabilire i tipi di meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza dell'obesità in modo da poter evitare lo stato irreversibile manifestato dai pazienti colpiti da tale malattia che, nel peggiore dei casi porta alla disabilità, riducendo di molto la qualità della vita (Zheng et al., 2014). Tale patologia considerata una piaga sociale che è ulteriormente aggravata dall'assenza di trattamenti farmacologici specifici ed efficaci, ha spinto la ricerca verso l'individuazione del tipo di meccanismo d'azione che opera durante i processi metabolici e, di conseguenza, verso l'introduzione di nuovi farmaci capaci di ridurre uno dei più importanti stimoli legato all'obesità ovvero l'appetito. Per questo scopo, nuovi e appropriati modelli sperimentali, in grado di simulare le stesse condizioni nell'uomo, stanno fornendo ulteriori indicazioni sulla validità terapeutica di tali farmaci (O'Rahilly and Farooqi, 2008; Lutz and Woods, 2012). In questo caso il criceto Siriano, *Mesocricetus auratus*, un roditore ibernante facoltativo sta trovando sempre più spazio come modello ideale per studi sul metabolismo lipoproteico (Dillard et al., 2010), poiché è in grado di sviluppare obesità e resistenza insulinica in seguito all'esposizione sia di una dieta ricca di carboidrati che soprattutto una HFD (Costa et al., 2011; Dalbøge et al., 2015). Di conseguenza tale roditore viene considerato un modello utilissimo per l'identificazione dei fattori che giocano un ruolo chiave nella patogenesi dell'obesità, mediante studi sia *in vivo* che *in vitro* oltre a costituire

un eccellente modello per la valutazione di farmaci sulla perdita di peso, la tolleranza al glucosio, ipercolesterolemia ed ipertrigliceridemia.

### I.1 Obesità e alterazioni fisiologiche

L'obesità è una patologia metabolica caratterizzata da un alterato equilibrio dei segnali neuronali del *feeding* e dell'omeostasi energetica, con conseguente accumulo anomalo o eccessivo di tessuto adiposo (Davis et al., 2013, 2014; Singh et al., 2014). Il nostro organismo, infatti, per favorire il corretto funzionamento dei vari sistemi fisiologici (termoregolazione, metabolismo basale e mantenimento della dimensione corporea), sia in condizioni basali che attive (attività fisica), è in grado di coordinare ciclicamente una parte di energia in entrata che deriva dal cibo ingerito (Fig.I.1). Difatti, quando l'assunzione giornaliera di energia è esattamente bilanciata dalla spesa energetica, si ottiene uno stato di equilibrio energetico che mantiene il peso corporeo costante. Al contrario, nel momento in cui l'energia in ingresso supera fortemente la richiesta fisiologica, si ottiene uno stato di equilibrio energetico positivo (aumentata assunzione di calorie dal cibo) che viene immagazzinato principalmente sotto forma di grasso corporeo (Campfield and Smith, 1999; Hill et al., 2012; Müller et al., 2016), determinando tra le altre cose, un'alterazione del controllo cerebrale delle principali attività fisiologiche e comportamentali.

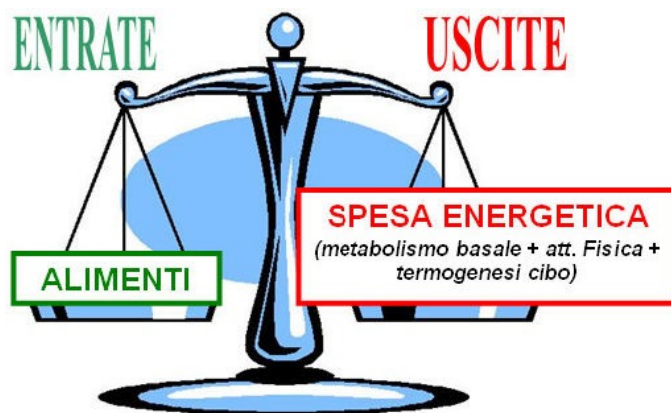


Fig.I.1 Componenti del sistema di regolazione del bilancio energetico.

Difatti, nel fenotipo obeso l'accumulo di grasso avviene principalmente negli adipociti del tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT) e nella cavità intraperitoneale, sebbene anche il fegato e altri organi potrebbero accumularne in condizioni di obesità (Borges et al., 2017; Xu et al., 2017). Lo SCAT



funziona come un dispersore metabolico in cui gli acidi grassi liberi in eccesso (FFAs) e il glicerolo sono immagazzinati come trigliceridi (TRIG) in adipociti (Duncan et al., 2007). Quando la capacità di immagazzinamento di tale tessuto viene superata o la sua capacità di generare nuove cellule adipose è compromessa, a causa della predisposizione genetica o di fattori stressogeni (stress fisiologico e mentale), il grasso inizia ad accumularsi in aree al di fuori di tale distretto (Borges et al., 2017). Al contrario, fattori più severi, come lo stress cronico, porta ad elevati livelli di cortisolo nel tessuto adiposo viscerale (VAT).

Le differenze anatomiche e fisiologiche tra il VAT e il SCAT aiutano a spiegare l'aumento dei rischi metabolici e cardiovascolari associati all'obesità addominale (Dadson et al., 2017). In particolare, mentre il VAT contiene un maggior numero di grandi adipociti, nonché una maggiore produzione di marker infiammatori e di adipochine pro-infiammatorie e pro-trombotiche, lo SCAT differentemente presenta adipociti più piccoli e sensibili all'insulina, con elevato assorbimento di FFA e TRIG, impedendo la loro deposizione nel tessuto non adiposo (Ibrahim et al., 2010). Le cattive abitudini alimentari e la ridotta attività fisica tendono a favorire l'attivazione delle cellule adipose inducendo un processo infiammatorio da parte del tessuto adiposo bianco. Tale risposta infiammatoria determina un aumento dei glucocorticoidi, che causano lo sviluppo e la differenziazione dei preadipociti in adipociti (de Kloet and Herman, 2017). Si crea un rimodellamento cellulare durante il quale gli adipociti aumentano di numero (iperplasia) e di dimensioni (ipertrofia). L'ipertrofia è indotta dall'accumulo di grassi e dall'aumentata espressione di mediatori infiammatori. Gli adipociti ipertrofici, a loro volta, fanno virare la risposta immunitaria verso la produzione di ulteriori molecole infiammatorie, le adipochine, con conseguente aumento di infiltrato macrofagico (Bays et al., 2008). In passato si riteneva che l'aumento delle cellule adipose poteva verificarsi soltanto durante l'infanzia e l'adolescenza e che un eccesso di energia nei bambini determinava un'obesità iperplastica (Sarafoglou et al., 2017). Al contrario, una volta raggiunta l'età adulta l'organismo tende ad immagazzinare grassi aumentando la dimensione delle cellule adipose sviluppando così un'obesità di tipo *ipertrofica*.

Studi recenti hanno dimostrato, invece, che nuovi adipociti si possono differenziare da preadipociti in alcuni periodi della vita e che lo sviluppo dell'obesità negli adulti è accompagnato non soltanto da un aumento della dimensione ma anche del numero di tali cellule. I soggetti obesi, infatti, presentano un numero di cellule adipose quattro volte maggiore e una quantità di lipidi due volte superiore rispetto ai soggetti normopeso (Druce et al., 2004). Assumendo che un individuo sano non abbia problemi di assorbimento nutrizionale, le riserve energetiche aumenterebbero solo

se l'*energy intake*, la quantità di energia che si ottiene attraverso l'assunzione di cibo, superasse l'*energy expenditure* totale ovvero la quantità di energia utilizzata dall'organismo per favorire la funzionalità degli organi vitali (cuore, cervello e polmoni), la digestione, l'assorbimento di nutrienti e l'esercizio fisico determinando lo sviluppo dell'obesità. È chiaro che ci sono delle differenze tra gli individui per quanto riguarda la loro tendenza ad accumulare grasso ma, ancora oggi, le cause di tale condizione non sono conosciute e molte ricerche scientifiche risultano contrastanti.

## **I.2 Ruolo del SNC nella regolazione del *feeding behavior***

Il *feeding behavior* è il risultato di una ricca e complessa combinazione tra i segnali circolanti di disponibilità energetica e i sofisticati circuiti cerebrali che codificano il diverso repertorio comportamentale necessario per acquisire e consumare alimenti (Berthoud, 2004; Fulton, 2010; Betley et al., 2013; Sternson, 2013). Il desiderio di mangiare e la sensazione di sazietà, che deriva dall'aver consumato un pasto, sono aspetti del comportamento semplici e naturali ma che, se alterati, possono portare a gravi situazioni patologiche (Woods and D'Alessio, 2008). Tra i distretti anatomici in grado di svolgere diverse funzioni in tale contesto, il SNC esercita sicuramente un ruolo dominante di controllo dello stato metabolico, attraverso i circuiti sensoriali provenienti dai vari distretti fisiologici. In particolar modo, l'HTH rappresenta la sede encefalica chiave, sottoposta ad un continuo flusso di segnali derivanti dalle aree cerebrali superiori e dalla periferia, dotati di azione oressizzante (stimola il *food intake*) o anoressizzante (inibisce il *food intake*), che lo informano in tempo reale circa le condizioni energetiche–nutrizionali dell'organismo. Tale area encefalica a sua volta può direttamente controllare il metabolismo energetico producendo neuropeptidi in grado di modulare sia il comportamento alimentare che la spesa energetica degli organi periferici. Secondo il modello di Teitelbaum e Stellar, tuttora ritenuto valido (Teitelbaum e Stellar, 1954), nell'HTH vi sono due centri distinti che regolano la fame e la sazietà, il "*Feeding Center*" e il "*Sazietà Center*". Il "*Feeding center*" è localizzato nel nucleo dell'HTH laterale (LHA) ed è stato constatato che, a seguito a delle lesioni o l'inattivazione, tale centro è responsabile dell'anoressia. Parallelamente il "*Sazietà Center*", che è situato nei nuclei ventromediale (VMN) e paraventricolare (PVN), dimostra di essere in grado di indurre obesità. Questi centri ipotalamici devono essere intesi come "reti nervose" che, in collegamento con altre strutture encefaliche

(corteccia cerebrale, sistema limbico, sistema nervoso autonomo), ricevono segnali da ambienti esterni ed interni (Anand and Brobeck, 1951).

Il controllo integrato neurale, metabolico e ormonale dell'assunzione di cibo presuppone l'interazione di cinque classi di segnali interni quali: i neuropeptidi ipotalamici, l'insulina cerebrale, la proteina OB (leptina), i segnali metabolici (inclusi i decrementi transitori della concentrazione di glucosio nel sangue) e gli ingressi neurali ascendenti e discendenti. La regolazione a lungo termine del *food intake* e dell'omeostasi energetica è sotto l'azione della leptina, un sensore energetico in grado di modulare l'attività di importanti fattori del metabolismo lipidico (Campfield and Smith, 1999). Essa rappresenta l'ormone della sazietà che viene secreto dagli adipociti in proporzione alla quantità di tessuto adiposo presente (Ahima, 2008). Questa proteina gioca un ruolo chiave nell'omeostasi energetica, informando il cervello sui cambiamenti che si verificano al fine di mantenere inalterato il bilancio energetico e riguardo la quantità di alimenti conservati sotto forma di grasso. La leptina, infatti, agisce a livello cerebrale come regolatore del feedback negativo dell'adiposità, trattenendo la massa grassa per limitare l'*energy intake* e per sostenere la spesa energetica (Wasin, 2015). Al contrario, un diminuito *signaling* di tale ormone promuove un incremento del *food intake*, un bilancio energetico positivo e l'accumulo di grasso (Morton et al., 2006; Du et al., 2016). Sebbene i livelli di leptina plasmatica riflettano in modo affidabile la quantità di massa grassa in condizioni stabili di peso, essi possono anche variare in risposta alle alterazioni a breve termine del bilancio energetico, prima che cambiamenti significativi del peso corporeo possano verificarsi (Chin-Chance et al., 2000).

Uno studio condotto su topi magri *AKR/J* e topi DIO ha mostrato quanto siano necessarie dosi più elevate di leptina al fine di ottenere un miglior comportamento alimentare, un corretto metabolismo e la perdita di peso negli individui obesi (Tang et al., 2012). Difatti, mentre i topi *AKR/J*, una volta alimentati con una dieta ad alta percentuale di grassi e ad alta densità di energia, esibivano obesità e presentavano un'elevata concentrazione di leptina e insulina nel siero, i topi DIO diversamente richiedevano dosi intraperitoneali maggiori di leptina per alterare l'assunzione di cibo, il metabolismo e il loro grasso corporeo (Halaas et al., 1997).

Recenti studi hanno dimostrato che la reattività del cervello verso tale ormone è ridotta negli animali obesi a causa di uno o più difetti intrinseci o regolatori nel pathway di segnalazione post-recettore e/o nel diminuito trasporto di leptina nel cervello (Wang et al., 2014). Gli effetti della leptina sul bilancio energetico, infatti, sono mediati dai recettori leptinergici presenti in diverse

aree ipotalamiche come il nucleo arcuato (ARC), il nucleo PVN e VMN, e nella LHA (Morton et al., 2006; Meek et al., 2013; Fig.I.2).

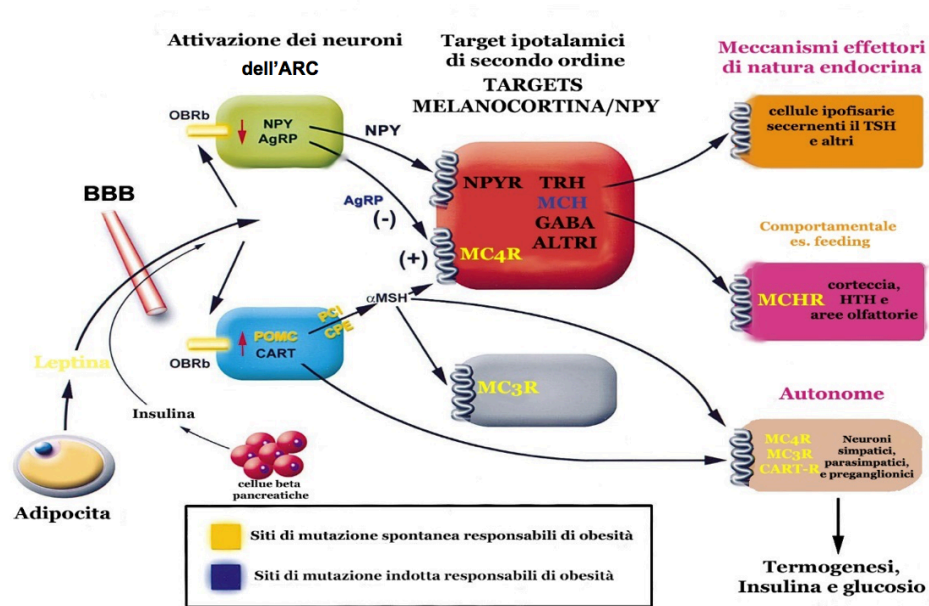


Fig.I.2 Circuito della leptina azione sull'omeostasi energetica e sul peso corporeo.

Tuttavia anche regioni extra-ipotalamiche, come il nucleo del tratto solitario (NTS) nella regione centrale del mesencefalo, sono leptino-sensibili per l'azione di ricompensa e motivazione (Figlewicz et al., 2010). L'importanza di questo sito recettoriale è stato osservato nei soggetti *Knock-out* (KO) per il recettore leptinergico, i quali mostrano delle somiglianze fenotipiche con quelli carenti di leptina, soprattutto per il veloce aumento di peso nei primi mesi di vita, con un'iperfagia grave e anomalie endocrine (Carter et al., 2013; Cox et al., 2016).

A livello ipotalamico è stato individuato l'ARC come il sito chiave per rilevare e integrare i segnali del bilancio energetico periferico, includendo ormoni (leptina, insulina e grelina) e nutrienti (acidi grassi, amminoacidi e glucosio) al fine di determinare il "switching-on or -off" dei processi energetici (Djogo et al., 2016). Tali effetti sono mediati, all'interno di questa area ipotalamica, da almeno due distinte sottopopolazioni di neuroni leptino-sensibili tra i quali esiste una relazione di inibizione reciproca: quando uno è attivo l'altro è inibito e viceversa. Tra questi sono presenti i neuroni "cocaine-amphetamine regulated transcript" (CART), così chiamati perché i loro livelli aumentano in seguito ad assunzione di cocaina e amfetamine e i neuroni che esprimono la pro-opiomelanocortina (POMC) che sintetizzano e rilasciano l' $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone) in seguito al suo clivaggio post-traduzionale, potentemente anoressigenici e stimolati da

segnali di sazietà come leptina e insulina (Jovanovic et al., 2010). La seconda classe di neuroni leptino-sensibili, localizzati accanto alle cellule POMC, sono neuroni oressigenici che esprimono il NPY, l'agouti related protein (AgRP) e un antagonista endogeno del recettore 4 della melanocortina (MC4R), che vengono inibiti dalla leptina, dall'insulina, da PYY3-36, e vengono stimolati dalla grelina. Di conseguenza, la perdita di peso attiva questi neuroni attraverso una combinazione tra ridotti inibitori e incremento di input stimolatori. NPY/AgRP sinaptano e si inibiscono con i neuroni POMC ed entrambi i tipi cellulari regolano il bilancio energetico mediante proiezioni a regioni cerebrali che influenzano il *motivation/reward*, la spesa energetica, l'appetito e il comportamento alimentare (Aponte et al., 2011; van Swieten et al., 2014). Un bilancio energetico negativo e la perdita di peso abbassano i livelli plasmatici dei segnali di feedback negativo (leptina e insulina) mentre aumentano i livelli di grelina. In particolare, è stato osservato come l'assenza di leptina nei topi obesi (*Lepob/Lepob*) riduca nell'ARC l'espressione di POMC mentre aumenti i livelli oressigenici di NPY e AgRP, imitando la risposta ipotalamica alla fame attraverso un bilancio energetico positivo e il ripristino della quantità di grasso perso (Morton et al., 2006). Analogamente, l'assenza di  $\alpha$ -MSH nei topi KO per POMC causa iperfagia e obesità mentre il blocco della segnalazione melanocortina neuronale diminuisce la risposta alla somministrazione centrale di leptina (De Jonghe et al., 2012). Per contro, la mancanza di NPY, AgRP o entrambi i geni provoca solo lievi difetti nel bilancio energetico suscitando domande sulla relativa importanza dei segnali oressigenici e anoressigenici nell'assunzione di cibo e nella regolazione del peso corporeo. I neuroni NPY/AgRP, inoltre, sono ricchi del neurotrasmettitore inibitorio l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) un importante regolatore del *feeding* (Tong et al., 2008; Wu et al., 2009). Difatti, studi condotti su specifiche aree encefaliche hanno mostrato come i neuroni AgRP GABAergici che si proiettano al nucleo parabrachiale (PBN) stimolino l'assunzione di cibo mentre il blocco di questo circuito, sulla stessa struttura cerebrale, induca anoressia (Wu et al., 2011). Recentemente è stato rilevato che i neuroni che producono GABA rappresentano un'altra popolazione di cellule coinvolte nel percorso di segnalazione della leptina ipotalamica (Vong et al., 2011). Da questi studi effettuati su topi KO per il recettore della leptina (*LepRb*) sui neuroni GABAergici (Vong et al., 2011) è emerso da subito l'insorgenza di una forte obesità mentre in topi obesi omozigoti per l'allele *LepR<sup>S1138</sup>* la capacità di diminuire acutamente il tono inibitore del GABA è risultata inalterata, nonostante la perdita degli effetti catabolici della leptina. In questo contesto, la caratterizzazione di segnali non identificati capaci di modulare i

neuroni ipotalamici in risposta alla leptina può essere considerata, ad oggi, una delle principali sfide della ricerca corrente nella neurobiologia dell'obesità.

Come sottolineato precedentemente, le cellule dell'ARC, tra cui i neuroni POMC/ CART e NPY/AgRP /GABA, sono strategicamente posizionati come collegamento tra segnali omeostatici periferici (anabolici e catabolici) e circuiti ipotalamici coinvolti nell'equilibrio energetico. Tra i principali ormoni anabolici, coinvolti nella regolazione dell'appetito, la grelina è emersa essere una dei più significativi (Hassouna et al., 2016). Essa viene secreta dal tratto superiore dell'intestino, rilasciata primariamente dalle cellule endocrine situate nello stomaco e da alcuni neuroni ipotalamici con potenti proprietà oressigeniche, la cui concentrazione plasmatica aumenta in condizioni di digiuno, prima di ogni pasto. Sebbene i neuroni responsabili della produzione di grelina siano circoscritti all'HTH, i suoi recettori sono espressi in diverse aree cerebrali. Per mezzo di tali recettori la grelina stimola il rilascio dell'ormone della crescita a livello ipofisario ed è coinvolta nella regolazione del *feeding* e dell'omeostasi energetica oltre a promuovere l'appetito nei Mammiferi attraverso il potenziamento dei neuroni che sintetizzano la DA nell'area tegmentale ventrale (VTA; van der Plasse et al., 2015; Hassouna et al., 2016; MacKay et al., 2016). I meccanismi d'azione della grelina sull'appetito e sul *food intake* sono primariamente mediati attraverso input periferici trasmessi dall'ARC al NTS. Difatti, i bersagli primari sono neuroni che esprimono e rilasciano NPY e AgRP nell'HTH laterale e nel LHA per mediare l'effetto oressigenico a livello cerebrale (MacKey et al., 2016). Allo stesso tempo, la grelina può anche inibire i neuroni situati nell'ARC, contenenti  $\alpha$ -MSH e POMC, che mediano l'effetto anoressigenico nel PVN (Konturek et al., 2004; Sobrino Crespo et al., 2014). Numerosi studi condotti sull'uomo hanno messo in evidenza l'azione stimolante della grelina sull'assunzione di cibo, antagonizzando così l'azione della leptina e dell'insulina (Rubenstein et al., 2013). La forma esogena dell'ormone oressizzante diminuisce il rilascio e l'azione della leptina e viceversa la forma esogena dell'ormone della sazietà riduce i livelli di grelina plasmatica. Questo porterebbe a supporre che l'effetto della leptina sulla riduzione del peso corporeo non viene mediato soltanto al livello centrale dall'HTH ma anche attraverso un effetto inibitorio a livello periferico sul rilascio della grelina (Sobrino Crespo et al., 2014; Fig.I.3).

Un altro peptide simile alla grelina che tende a ripristinare le riserve energetiche mediante un maggior accumulo di cibo è l'NPY. Questo è un polipeptide diffuso nel SNC e nel sistema nervoso autonomo in grado di regolare diversi processi fisiologici come l'aumento dell'appetito, la

modulazione della risposta vasoconstrictrice innescata dai neuroni noradrenergici, il ritmo circadiano, la locomozione, l'ansia, l'epilessia, l'apprendimento e la memoria (Mercer et al., 2011).

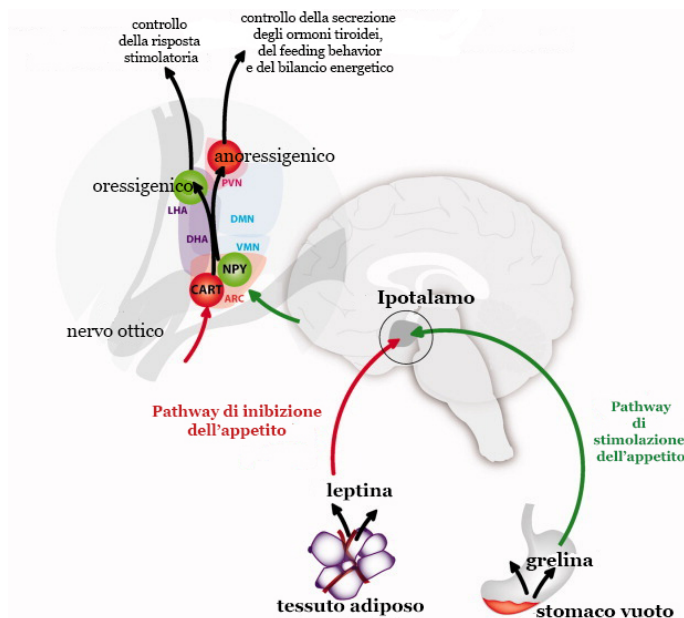


Fig.I.3 Stimolazione e soppressione dell'appetito esercitata a livello dell'HTH.

Nel SNC, il NPY è stato individuato in elevate concentrazioni all'interno dell'HTH, soprattutto a livello dell'ARC insieme a AgRP, del tronco cerebrale e dell'ipofisi anteriore. La sintesi e la secrezione del NPY nell'ARC, è indotta in risposta ad uno stato di deficienza energetica e di una maggiore domanda metabolica in caso di un aumentato esercizio fisico, durante il freddo o in gravidanza (Leibowitz and Wortley, 2004). Il NPY stimola l'assunzione di cibo, agendo principalmente sui recettori, NPY1R e NPY5R, che si trovano largamente distribuiti in tutto il cervello con una maggior preferenza per le aree ipotalamiche come il PVN, VMN e LHA. Questo peptide è in grado di "cross-talk" con altri fattori peptidici presenti nel SNC, regolando l'utilizzo dell'energia mediante la modulazione del deposito di grasso e del metabolismo (Yam et al., 2017). Essendo il NPY co-espresso insieme a LepRb nell'ARC, ciò suggerisce che le cellule che producono NPY possono essere uno dei principali target d'azione della leptina (Sun et al., 2016). In tale contesto, studi condotti su topi ob/ob, che possedevano entrambe le copie del gene difettoso OB della leptina, hanno mostrato un comportamento e una fisiologia tipici di animali in stato di digiuno permanente, con livelli di espressione di NPY ipotalamici aumentati e appetito incontenibile; al contrario il trattamento con leptina ha portato una significativa riduzione di NPY

ancora prima di un qualsiasi cambiamento del peso corporeo (Li, 2011). A livello periferico, l'NPY è ampiamente distribuito a livello dei nervi simpatici, del midollo, delle piastrine e nei vari tipi di adipociti (Hirsch and Zukowska, 2012). Un aumento dell'espressione del NPY nel tessuto adiposo sembra essere una caratteristica comune dell'obesità in diverse specie (Yang et al., 2008). Difatti, è stato dimostrato che il NPY ha effetti iperplastici, adipogenici e antilipolitici sugli adipociti ed effetti angiogenici sulla vascolarizzazione che circonda le cellule adipose e che contribuisce all'espansione della massa grassa sia *in vitro* che *in vivo* (Kuo et al., 2008; Rosmaninho-Salgado et al., 2012).

Tra i fattori oressigenici che stimolano il *food intake* e l'omeostasi energetica è incluso anche il sistema orexigenico (Messina et al., 2017). Le orexine sono ampiamente distribuite nel SNC in particolar modo nell'HTH laterale ma anche nei nuclei sopraottici ipotalamici, il PVN, l'AMY, l'eminenza mediana e l'ependima (Nixon and Smale, 2007). La distribuzione delle orexine nei corpi cellulari a livello ipotalamico suggerisce che quest'ultime siano coinvolte nel *feeding behavior* (Nalund et al., 2005; Nixon et al., 2012). Numerosi studi hanno evidenziato come l'iniezione di orexina A (ORXA) e orexina B (ORXB) stimoli l'ingestione nei ratti, sebbene la prima sembra avere un'azione maggiore. Gli effetti dell'ORXA sul comportamento alimentare dipendono da interazioni con altri segnali come il rilascio del NPY, la leptina, l'ormone concentrante della melatonina (MCH), la grelina, la galanina e l'AgRP. In particolare, i neuroni dell'orexina proiettano nell'ARC e specificamente innervano i neuroni NPY (Fu et al., 2004). In accordo con queste osservazioni, il pretrattamento con un'antagonista selettivo del recettore NPY-Y1 ha parzialmente inibito l'assunzione di cibo stimolata dall'orexina suggerendo che l'azione orexigenica di quest'ultima sia solo in parte mediata dall'attivazione dei neuroni NPY. Le orexine, inoltre, mostrano una sensibilità inferiore alla leptina e ai peptidi anoressici rispetto al NPY. In recenti studi è stato osservato come l'assunzione di cibo indotta dal NPY venga completamente inibita dalla pre-somministrazione della leptina, mentre quella indotta dalle orexine sia solo parzialmente inibita (Goforth et al., 2014; Laque et al., 2015; Johnson et al., 2016). Si ipotizza, quindi, che l'azione delle orexine sul comportamento alimentare potrebbe essere largamente indipendente dal meccanismo centrale regolato dalla leptina e questo spiegherebbe il loro ruolo predominante nell'iperfagia osservata nei soggetti obesi (Zhu et al., 2002; Alò et al., 2017).

La sazietà postprandiale è stata attribuita a numerose molecole espresse e rilasciate all'interno del tratto gastrointestinale e dell'ARC ipotalamico, per inibire il *food intake* tramite la via di attivazione dei recettori presenti sui nervi afferenti, la maggior parte vagali, che stimolano il



centro della sazietà e inibiscono il centro del *feeding* (Konturek et al., 2004). Tra queste si individuano la colecistochinina (CKK) e il peptide YY (PYY) in cui la prima viene considerata il peptide della sazietà, prodotta dalle cellule duodenali endocrine, la seconda viene secreta dalle cellule L della mucosa intestinale dell'ileo e del colon e va ad inibire contrazioni intestinali, secrezioni pancreatiche e gastriche riducendo di conseguenza l'appetito (Steinert et al., 2017). La CKK media l'inibizione a breve termine del *food intake* e coopera con i segnali che originano dai meccanocettori intestinali, generati dalla distensione dell'intestino e trasmessi al cervello attraverso le afferenze vagali (Covasa, 2010). Tale ormone si trova in diverse forme nella mucosa ma anche nei nervi periferici e nei neuroni cerebrali e sembrerebbe che la sua azione indotta sulla sazietà diminuisca durante l'*high fat (HF) feeding*, nonostante l'aumento dei livelli di CCK in circolo (Rehfeldt et al., 2004). Similmente alla CKK, il PYY, attraverso il flusso sanguigno, raggiunge l'ARC ipotalamico dove agisce sui neuroni oressigenici inibendo il rilascio del NPY e riducendo la fame in seguito alla diminuzione dell'appetito per circa 12 ore (Holzer et al., 2012). Entrambi gli ormoni gastrici, in maniera discontinua, preservano la loro attività anoressigenica e sembrano avere un'azione compensatoria sull'*overeating* tali peptidi risultano pertanto dei possibili target specifici nella cura dell'obesità.

### **I.2.1 Patogenesi dell'obesità e sistemi neuronali coinvolti**

La patogenesi dell'obesità può essere considerata come la somma di quei fattori biologici che aumentano la predisposizione all'incremento del peso corporeo insieme alle conseguenze di uno stile di vita "sbagliato" che promuove un'assunzione di cibo eccessiva e che riduce l'attività fisica. Sebbene l'organismo umano abbia evoluto meccanismi fisiologici in grado di difendersi dalla perdita di peso, non si hanno molte conoscenze sul meccanismo con il quale il sistema omeostatico è in grado di contrastare l'acquisto eccessivo di grasso, causa principale dell'attuale incremento dell'obesità nei paesi industrializzati (Rosenbaum et al., 2005). Negli ultimi anni è stato osservato che, oltre ai sistemi metabolici, anche i sistemi di ricompensa del cervello svolgono un ruolo importante nel comportamento alimentare (Kenny, 2011; Tulloch et al., 2015). In generale, i cibi poco appetitosi non vengono consumati in eccesso, mentre gli alimenti gradevoli vengono spesso consumati anche dopo che i requisiti energetici sono stati rispettati. La facilità di accesso ad un cibo ad alto consumo energetico e l'eccessivo abuso è considerato un importante fattore di rischio ambientale per l'obesità (Swinburn et al., 2009). Mentre l'*overfeeding* può ridurre le risposte

neuronalmente a cibi gradevoli, in particolare nella corteccia insulare e nell'HTH (Cornier et al., 2009), il valore edonico del cibo è influenzato dallo stato metabolico, suggerendo che i regolatori del metabolismo come la leptina e la grelina possono influenzare l'attività "dei sistemi del piacere" nel cervello. In accordo con questa visione, i soggetti umani trattati con leptina o il PYY, o quelli sottoposti a distensione gastrica che imitano l'ingestione del pasto (Volkow et al., 2011), presentano una ridotta attività nelle regioni cerebrali correlate alla ricompensa. Al contrario, i pazienti iperfagici con deficienza congenita di leptina dimostrano un'aumentata attività nella corteccia insulare e nello striato in risposta al cibo. Parallelamente, i recettori della leptina vengono espressi sui neuroni dopaminergici mesencefalici suggerendo il coinvolgimento di tale ormone negli aspetti edonici del comportamento alimentare mediante la modulazione della trasmissione DAergica mesostriatale (Fernandes et al., 2015). Il sistema DAergico rappresenta un importante sistema neurotrasmettitoriale fortemente implicato nei meccanismi di ricompensa e motivazione rispetto all'omeostasi energetica (de Araujo et al., 2010; Johnson et al., 2010; Vucetic and Reyes, 2010). Recenti studi hanno mostrato come l'infusione di leptina nella VTA mesencefalica dei ratti vada ad inibire l'attività dei neuroni della DA con conseguente diminuzione dell'assunzione di cibo (Krügel et al., 2003; Hommel et al., 2006). Viceversa, la ridotta presenza dei LepRb nella VTA induce, nello stesso modello sperimentale, un'aumentata assunzione di cibo, un'attività motoria avanzata e una maggiore preferenza per il cibo gradevole (Scarpace et al., 2013). Un ulteriore conferma dell'effetto inibitorio della leptina sul sistema DAergico è stato osservato nei ratti sottoposti a restrizioni alimentari con successiva aggiunta del saccarosio (una misura di cibo ricompensa). Anche in questo caso, la leptina blocca le proprietà gratificanti del saccarosio, durante la restrizione alimentare, similmente all'azione dell'antagonista del recettore DAergico  $\alpha$ -flupenthixolo (Figlewicz et al., 2001). Contrariamente alla leptina, la somministrazione di un ormone orexigenico come la grelina, nei ratti, esercita un effetto stimolante sulla DA (Abizaid et al., 2006; Jerlhag et al., 2006, 2007) e aumenta il valore gratificante del cibo (Perello et al., 2010). Presi insieme questi risultati dimostrano che il cibo gradevole attiva i sistemi di ricompensa del cervello e che i regolatori ormonali dell'appetito possono influenzare l'assunzione degli alimenti modulando la risposta edonica al cibo. L'attenzione crescente della comunità scientifica si è concentrata sul possibile ruolo di questi ormoni nella patogenesi dell'obesità umana. Difatti, negli individui obesi sono stati rilevati maggiori livelli plasmatici circolanti di leptina (resistenza alla leptina), proteina legante il retinolo 4, insulina (resistenza all'insulina) e grelina, mentre i livelli di adiponectina e PYY risultano essere ridotti (Du et al., 2016). Sino ad oggi nell'uomo, non sono

state identificate mutazioni del gene per la leptina capaci di indurre obesità e pertanto viene sostenuto che, nella maggioranza dei casi, la patogenesi dell'obesità umana sia quindi radicalmente diversa da quella dei topi *ob/ob* (Liu et al., 2017; Trojova et al., 2017). Studi compiuti negli ultimi anni hanno portato alla scoperta di un'aumentata espressione dell'acido ribonucleico messaggero (mRNA) specifico del gene *ob* in pazienti con obesità grave, suggerendo pertanto che l'obesità nell'uomo non dipenda da un deficit di espressione del gene *ob* e quindi da una relativa carenza di leptina, quanto piuttosto ad una resistenza periferica dei tessuti bersaglio e principalmente del SNC alla leptina stessa (Illison et al., 2016; Fig.I.4).

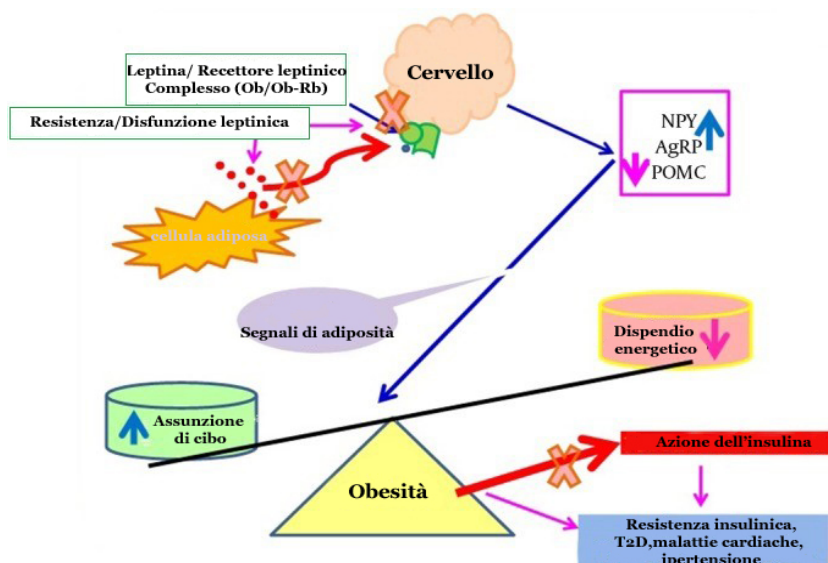


Fig.I.4 Conseguenze del circuito leptinergico alterato.

L'ipotesi che la resistenza leptinica contribuisca alla patogenesi dell'obesità è sostenuta anche da studi condotti sui roditori che, a seguito di una HFD, hanno acquisito una perdita straordinaria della sensibilità alla leptina nei neuroni dell'ARC (Wierucka-Rybak et al., 2016). Per tale motivo, la delezione dei recettori per la leptina, in diverse sottopopolazioni neuronali dell'HTH, è sufficiente per causare l'obesità nei topi (Van de Wall et al., 2008; Shi et al., 2010). La resistenza leptinica è rilevabile nei neuroni ARC persino dopo un breve periodo di trattamento con una HFD, ancor prima di un sostanziale aumento del peso corporeo (Münzberg et al., 2004). A livello cellulare, lo stato pro-infiammatorio delle cellule gliali, indotto da tale dieta, come anche la proliferazione di astrociti e di cellule microgliali, costituiscono una risposta precoce, che non solo è responsabile di modificazioni strutturali e funzionali a livello ipotalamico ma rappresenta anche un importante mediatore della resistenza leptinica (Argente-Arizòn et al., 2017; Martin et al., 2017).

Difatti, nonostante la risposta infiammatoria precoce sia indice di un effetto neuroprotettivo, il mantenimento di uno stato infiammatorio cronico potrebbe causare, tra le modifiche funzionali ipotalamiche, la perdita di risposta alla leptina (Hovarth et al., 2010; Thaler et al., 2012, Wu et al., 2014). È interessante notare una stretta correlazione tra gli astrociti e la sensibilità leptinica poiché l'assenza del suo recettore nei primi è associata ad una morfologia delle cellule gliali alterata e ad una modificazione della risposta sinaptica, la quale potrebbe diventare un elemento fondamentale nelle condizioni di obesità. In particolar modo, è stato osservato come i topi KO per LepRb negli astrociti mostrano una ridotta sensibilità leptinica, mentre l'attivazione delle cellule microgliali è stata associata ad una disfunzione dei neuroni POMC indotta dalla dieta iperlipidica (Gao et al., 2014; Kim et al., 2014).

Si può dire, quindi, che le lesioni ipotalamiche durante l'assunzione di diete ricche di grassi si verificano prima dell'obesità. Sebbene le conoscenze ottenute da questi lavori necessitino di ulteriori studi, l'osservazione di lesioni cerebrali, acquisite nell'area centrale adibita all'omeostasi energetica, offre un plausibile meccanismo per spiegare il processo infiammatorio, che si esplica a livello ipotalamico, e la difesa che si attua nei confronti di un elevato livello di grasso corporeo in individui obesi (Thaler et al., 2011). Nonostante tali osservazioni forniscono importanti conoscenze sulla patogenesi dell'obesità, ulteriori studi risultano essere necessari.

### **I.3 Obesità e Infiammazione**

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha dimostrato che alla base dei disordini metabolici, accanto ad uno stile di vita non corretto, ricco di eccessi, esiste una risposta negativa da parte del tessuto adiposo, che non essendo in grado di eliminare il grasso accumulato, si infiamma sviluppando gravi conseguenze nella salute umana (Norris and Blesso, 2017). L'infiammazione, infatti, è una risposta fisiologica necessaria per ripristinare l'omeostasi alterata da stimoli diversi. Per decenni il tessuto adiposo è stato considerato un vero e proprio deposito di energia e un mezzo di isolamento termico e meccanico. Più recentemente esso è stato riconosciuto come un complesso organo endocrino, in grado di secernere numerose sostanze bioattive come le adipochine, con molteplici azioni a livello locale e sistemico (Morshedzadeh et al., 2017). Difatti, quando nell'organismo si viene a creare una condizione di bilancio energetico positivo, con introito energetico che supera i consumi, il tessuto adiposo subisce delle modificazioni morfologiche e metaboliche che determineranno una maggior espressione di ormoni e citochine ad azione pro-infiammatoria, come l'interleuchina-6

(IL-6) e il “*tumor necrosis alfa*” (TNF- $\alpha$ ), e una minore produzione di quelle ad azione antiinfiammatoria come l’adiponectina (Grabmann et al., 2017). Queste alterazioni indurranno, quindi, una “*infiammazione cronica di basso grado*”, che sembrerebbe avere un ruolo fisiopatologico importante nello sviluppo dell’obesità. Tra i numerosi fattori, alla base del processo infiammatorio, c’è sicuramente l’eccesso di grasso accumulato con la dieta, che porterà ad importanti alterazioni morfologiche degli adipociti inizialmente ipertrofiche e successivamente iperplastiche, con conseguente sviluppo di ipossia e ridotta vascolarizzazione adipocitaria. Lo stato di ipossia, a sua volta, determinerà una condizione di stress per il reticolo endoplasmatico, contribuendo all’alterata produzione di adipochine (Bambace et al., 2011). Un altro importante meccanismo alla base dell’infiammazione cronica nell’obesità è l’infiltrazione di cellule infiammatorie nei macrofagi e nei linfociti del tessuto adiposo. Tali cellule dal circolo periferico verranno chiamate in sede grazie alla produzione e all’immissione di chemochine, quali ad esempio “*monocyte chemotactic protein-1*” (MCP-1) e “*vascular cell adhesion protein*” (VCAM), da parte degli adipociti (Desal et al., 2017). Conseguenzialmente, la presenza di numerose citochine proinfiammatorie, in circolo, andrà ad aumentare la risposta flogistica del tessuto. Difatti, nelle persone obese le concentrazioni circolanti di queste molecole sono molto alte rispetto ai soggetti magri e si crede svolgano un ruolo chiave nell’insorgenza dell’insulino-resistenza (Panee et al., 2012). Tra le citochine responsabili dell’infiammazione cronica vi è il TNF $\alpha$ , l’IL-6, l’interleuchina-17 (IL-17A) e l’interleuchina-1beta (IL-1 $\beta$ , Fatima et al., 2017). TNF- $\alpha$  è una citochina pro-infiammatoria pleiotropica che svolge un ruolo centrale nell’infiammazione, nello sviluppo del sistema immunitario, nell’apoptosi e durante il metabolismo lipidico, con numerosi effetti nel tessuto adiposo, inclusa la segnalazione dell’insulina (Swaroop et al., 2012). Alti livelli circolanti di TNF- $\alpha$  si osservano nei soggetti obesi mentre una significativa riduzione del peso corporeo comporta una ridotta presenza di tale fattore. Il TNF- $\alpha$ , inoltre, è in grado di favorire la secrezione di altre potenti citochine pro-infiammatorie come l’IL-6, mentre riduce citochine anti-infiammatorie come l’adiponectina (Hector et al., 2007). Tra le altre funzioni esercitate dal TNF- $\alpha$  è stato rilevato anche il coinvolgimento nell’apoptosi degli adipociti e nella resistenza all’insulina mediante l’inibizione del pathway di segnalazione del substrato del recettore dell’insulina-1.

IL-6 è una citochina che svolge ruoli importanti durante le reazioni in fase acuta, nell’infiammazione, nell’ematopoiesi, nel metabolismo osseo e nella progressione del cancro (Wang et al., 2017). Questa citochina regola l’omeostasi energetica e l’infiammazione in quanto è in grado di sopprimere l’attività della lipoproteina lipasi e di controllare l’appetito e l’assunzione di

energia a livello ipotalamico (Watt et al., 2005). IL-6 oltre ad essere importante nella transizione da malattie infiammatorie acute a malattie infiammatorie croniche (Hurst et al., 2001), contribuisce all'infiammazione cronica nelle disfunzioni metaboliche come l'obesità, la resistenza all'insulina, la malattia intestinale infiammatoria nonché nell'artrite infiammatoria, e nella sepsi quando è sregolata (Chaudhry et al., 2013). Recenti studi hanno mostrato che le citochine IL-6 e TNF- $\alpha$  aumentano insieme la lipogenesi epatica e innescano una risposta sistemica di fase acuta (Negrin et al., 2011; Rodríguez-Hernández et al., 2013). IL-1 $\beta$  è una citochina prodotta principalmente dai monociti in risposta a infezioni, lesioni, o sfida immunologica che favorisce l'innescarsi dei processi infiammatori in seguito a infezioni batteriche, stimola le cellule muscolari, epiteliali a produrre prostaglandine oltre ad indurre la produzione di altre citochine come l'interleuchina-2 (IL-2) e IL-6. Inoltre, recluta le altre cellule del sistema immunitario (Hong and Yu, 2017). L'IL-1 $\beta$  è nota anche con il nome di pirogeno endogeno in quanto è capace di stimolare la febbre anche in assenza di altri stimoli come antigeni batterici (Gabriel et al., 2017). Essa si lega a recettori presenti nelle cellule endoteliali dell'HTH, facendo aumentare la temperatura del corpo provocando la febbre. In queste condizioni, la replicazione batterica e virale diminuisce mentre aumenta l'efficacia della risposta immune. Negli ultimi anni è emerso il suo coinvolgimento nei disordini metabolici come istigatore prominente della risposta pro-infiammatoria nell'obesità (Bing et al., 2015). Tra i marker infiammatori coinvolti nelle disfunzioni metaboliche troviamo anche la proteina C reattiva (CRP) un fattore sistemico molto sensibile all'infiammazione, la cui concentrazione sierica aumenta rapidamente in risposta a una varietà di stimoli. L'infiammazione cronica di basso grado è stata osservata anche nei bambini obesi che presentano livelli più elevati di CRP rispetto ai bambini di peso normale (Kitsios et al., 2013). Alcuni studi, inoltre, hanno riferito che la perdita di peso, attraverso la dieta, è associata alla riduzione dei livelli circolanti di IL-6, TNF-alfa, CRP e altri marcatori di infiammazione, indipendentemente dall'età, dal sesso e dall'indice di massa corporea (BMI; Makki et al., 2013). Similmente la perdita di peso osservata nei soggetti dopo l'esposizione di un bypass gastrico ha ridotto i livelli di CRP e IL-6.

Le cellule T helper 17 (Th17), recentemente scoperte, rappresentano un nuovo sottoinsieme di cellule T4 o CD4 + coinvolte nei processi metabolici. In particolar modo la citochina IL-17A, è il primo membro di una famiglia di sei citochine pro-infiammatorie implicata nelle interazioni tra il sistema immunitario e i tessuti somatici (Li et al., 2017). Essa è coinvolta nell'infiammazione del tessuto con il rilascio di altre citochine pro-infiammatorie, nell'induzione della chemiotassi dei neutrofili nonché in condizioni autoimmuni e infiammatorie gravi come la sclerosi multipla, l'ictus,

la depressione, la malattia infiammatoria intestinale, in diversi tipi di infezioni a livello cerebrale e alcune forme tumorali, mentre la sua inibizione potrebbe avere un effetto benefico sulle condizioni patogene nel SNC (Waisman et al., 2015). L'IL-17A può, inoltre, regolare negativamente la neurogenesi nell'HIP adulto (Liu et al., 2014). Tuttavia, negli ultimi anni, la ricerca si è focalizzata sugli effetti dell'IL-17A sul tessuto adiposo e sulle implicazioni dell'obesità associata agli stati infiammatori. Difatti, diversi studi hanno rilevato che i livelli sierici di IL-17A aumentano significativamente sia nei topi che negli esseri umani obesi (Qu et al., 2016). È stato dimostrato che l'IL-17A può incrementare l'espressione di citochine TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Wang et al., 2013) i cui livelli sono già alti in tale patologia correlata all'insulino resistenza e all'infiammazione sistemica di basso grado. Sebbene questi dati suggeriscano uno stretto legame tra l'obesità, l'IL-17A e le malattie infiammatorie, attualmente non è chiaro se IL-17A influenzi il metabolismo e l'obesità o risulti aumentata a seguito di variazioni infiammatorie associate a tale disordine metabolico. Nel tessuto adiposo le cellule T $\gamma\delta$  producono IL-17A la quale agisce sui preadipociti e sugli adipociti per inibire l'adipogenesi e la moderata assunzione di lipidi e di glucosio. In effetti, mentre nei topi normali IL-17A può agire direttamente sulle cellule per ridurre la differenziazione dell'adipocita, l'assorbimento di glucosio e lipidi e la sensibilità all'insulina, l'inibizione della stessa citochina, nel suddetto modello animale, svilupperà un'obesità più debole, soprattutto in età adulta (Zúñiga et al., 2010), mediante un'alterata omeostasi glicemica (Eljaafari et al., 2015; Eik et al., 2016) soprattutto durante il netto stato iperglicemico che è un segno distintivo della resistenza insulinica, tipica della sindrome metabolica associata all'obesità. Recenti studi hanno rilevato come giovani topi *wild type* e KO per IL-17A, utilizzati nello studio del glucosio e dell'insulina, risultavano essere magri senza differenze significative in massa, indicando che IL-17A contribuisce all'omeostasi del glucosio sistemico anche prima dell'insorgenza dell'obesità (Xu et al., 2015; Hong et al., 2017). Tuttavia, sebbene i topi KO per IL-17 abbiano mostrato una migliore risposta metabolica rispetto ai topi *wild type*, tale protezione nei primi è stata persa a seguito dello sviluppo dell'obesità associata all'età, essendo loro stessi più suscettibili all'accumulo di una maggiore massa di tessuto adiposo nel tempo (Zúñiga et al., 2010). Un altro studio condotto sullo stesso modello sperimentale, ma di età inferiore (circa 6 mesi), invece, ha evidenziato come a seguito della somministrazione di una dieta HF, i topi mostravano una grave obesità rispetto ai topi controllo (Zhang et al., 2013). Le ragioni di questo fenomeno non sono chiare ma possono riflettere un avanzamento di altri meccanismi di infiammazione correlati all'obesità che sovrastano gli effetti della carenza di IL-17A. È interessante notare che l'assenza di IL-17A è stata associata anche ad

una significativa riduzione dell'insulina sierica (Chen et al., 2014). Contrariamente ai fattori pro-infiammatori, le citochine infiammatorie secondarie, quali l'IL-10 e il “*tissue growth factor-β*” (TGF-β), inducono un calo significativo del peso corporeo e dello stato infiammatorio, in quanto rilasciate tardivamente rispetto ai fattori pro-infiammatori e deputate al controllo della sintesi degli stessi, modulano l'intensità del processo infiammatorio e contribuendo alla sua risoluzione (Maioli et al., 2016; Morris et al., 2016). In particolare, un aumento dei macrofagi anti-infiammatori (M2) nel tessuto adiposo regola l'espressione di IL-10 proteggendo gli adipociti dalla resistenza insulinica indotta da TNF-α. IL-10 è prodotta da varie cellule del sistema immunitario innato e adattivo, ma la sua fonte principale sono i macrofagi (Ouyang et al., 2011; Toita et al., 2016; Galbraith et al., 2017) molto probabilmente attraverso interleuchina-33 (IL-33) responsabile della riduzione della colesterolemia (Zhang et al., 2017). È interessante notare che IL-10, citochina con un'emivita breve, è in grado di promuovere effetti anti-obesità e anti-infiammatori come evidenziato dal suo effetto benefico contro malattie infiammatorie ed autoimmuni come la psoriasi, malattie intestinale ed il lupus eritematoso sistemico (Asadullah et al., 2003; Ouyang et al., 2011; Toita et al., 2016). È plausibile che tale fattore stimoli i percorsi di segnalazione anti-infiammatori attraverso l'interazione con il suo recettore mentre la carenza dello stesso recettore nei macrofagi può portare a risposte infiammatorie severe e alla prominente produzione di citochine pro-infiammatorie (Shouval et al., 2014; Zigmond et al., 2014).

#### **I.4 Patologie associate all'obesità**

Gli studi di popolazione hanno dimostrato chiaramente che gli individui obesi hanno maggiori rischi di sviluppare numerose complicazioni sanitarie che contribuiscono alla morte prematura rispetto agli individui di peso normale (Wellen et al., 2005). Durante le varie valutazioni degli stati di obesità è emerso che oltre ad un precoce sviluppo della sindrome metabolica, sono state identificate altre comuni comorbidità associate a questa condizione, come disturbi endocrini (diabete mellito di tipo 2), problemi respiratori (ad esempio apnea del sonno), malattie cardiovascolari (aterosclerosi e attacchi cardiaci) e nei tumori di vari tessuti (Redinger, 2007). C'è da sottolineare che l'obesità ha impatti negativi non solo sulle questioni psicologiche e umoristiche, ma anche sulla funzione cognitiva (Solas et al., 2017; Fig.I.5). Attualmente, i problemi legati alla patologia del diabete sono molteplici e sempre più crescente come si può notare dal sostanziale aumento delle alterazioni metaboliche, sia i paesi sviluppati che quelli in via di sviluppo causando



numerosi casi di rischi di insulino-resistenza e di conseguenza stati iperglicemici associati a tale patologia anche in bambini (Wellen and Hotamisligil, 2005; Rogacka et al., 2017). Mentre nella fase precoce di diabete di tipo 2, la resistenza insulinica si attua in risposta ad uno stato di iperinsulinemia, dovuta ad un aumento della produzione di tale ormone da parte del pancreas, in uno stato più avanzato le cellule pancreatiche non riescono ad adeguarne la sintesi inducendo un aumento della glicemia post-prandiale. A tal proposito, numerose evidenze stanno supportano l'ipotesi secondo cui l'infiammazione sistemica cronica contribuisca a ridurre la sensibilità all'insulina nei tessuti periferici (Chen et al., 2015). Da questi lavori è risultato che l'infiammazione sistemica subclinica, misurata su livelli elevati di CRP e IL-6, è in grado di predire lo sviluppo del diabete (Marsland et al., 2010). Infatti, IL-6 può interferire con la segnalazione dell'insulina attraverso l'induzione di proteine che si legano al suo recettore mentre il TNF-  $\alpha$  è sovraespresso nei tessuti adiposi e muscolari di soggetti obesi e insulino-resistenti.

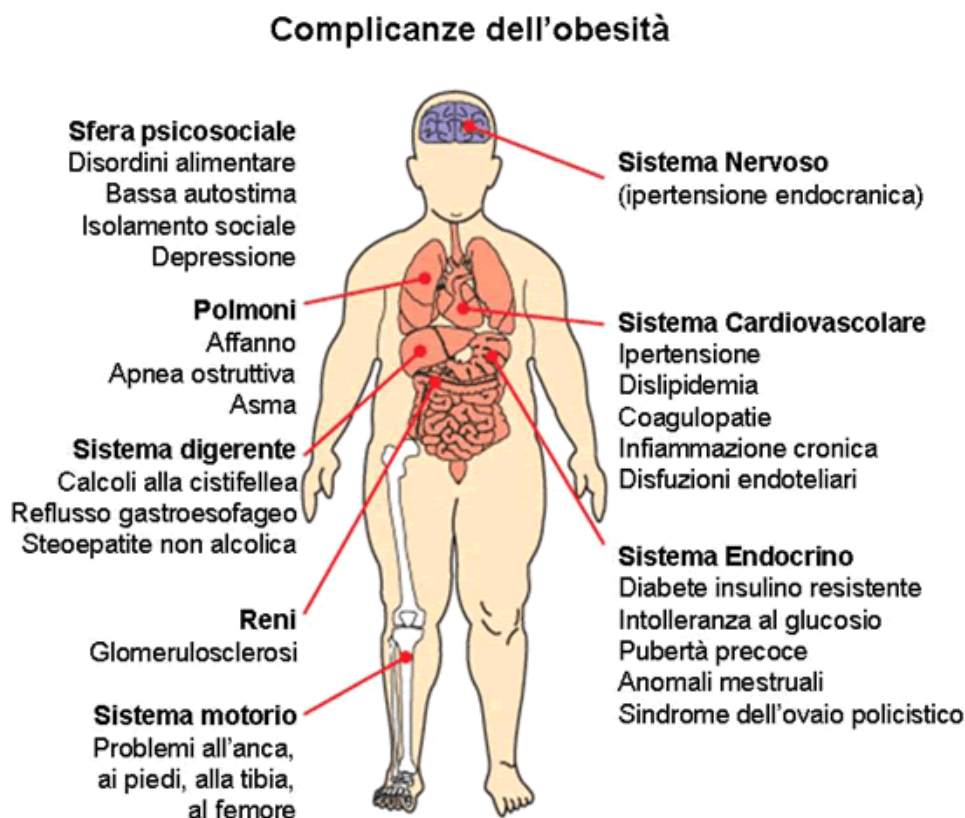


Fig.I.5 Patologie associate all'obesità.

Allo stesso tempo è stato rilevato che l'infiammazione cronica di basso grado è associata, anche, alla sindrome metabolica come indicato dalla significativa correlazione tra i livelli di CRP (Cooke et al., 2016) e le caratterizzanti condizioni della sindrome metabolica, tra cui l'adiposità, l'iperinsulinemia, la resistenza all'insulina, l'ipertrigliceridemia e il basso colesterolo HDL (Kotsis et al., 2010). Parallelamente, alti livelli di fattori infiammatori (CRP, TNF- $\alpha$  e IL-6), oltre a reagenti in fase acuta, sono associati ad un aumentato rischio d'insorgenza di eventi cardiovascolari. Lavori condotti dall'istituto "*European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group*" hanno stabilito che le concentrazioni di CRP sono più alte nei pazienti che presentano eventi coronarici soprattutto dopo l'infarto miocardico, identificando l'infiammazione come un forte indicatore degli eventi cardiovascolari mentre i livelli di CRP come prognostici chiavi delle patologie cardiovascolari (Thompson et al., 1995). Contestualmente, l'obesità produce un aumento del volume totale del sangue e della gittata cardiaca a causa di una maggiore richiesta metabolica indotta dall'eccesso di peso corporeo per cui il carico di lavoro cardiaco è maggiore durante gli intervalli di iperattività negli obesi). In questo caso un'elevata gittata cardiaca insieme ad una bassa resistenza periferica totale costituiscono un quadro di maggior rischio per lo sviluppo di un'ictus (Rodríguez-Hernández et al., 2013).

Le comorbidità che coinvolgono il sistema respiratorio includono l'apnea ostruttiva del sonno, che risulta dall'accumulo di tessuto adiposo aggiuntivo all'interno dei confini del tratto respiratorio superiore, e l'ipofaringe, che influenza negativamente la ventilazione, con ipossia secondaria e persino l'ipercapnia. Le cellule adipose bronchiali e peribronchiali secernono eccessive quantità di adipochine che portano ad un aumentato stato infiammatorio il quale, attraverso i danni apportati ai livelli della mucosa e subcutanea provocano malattie reattive delle vie aeree, compresa l'asma nelle donne. Anche l'embolia polmonare si presenta a tassi più alti nei pazienti obesi, in particolare in quelli con mobilità ridotta (Segula et al., 2014). L'infiammazione in molti tessuti e organi, è un fattore di elevato rischio anche per molte forme tumorali tra cui il seno, il colon, l'endometrio, l'esofago, il cancro epatocellulare, renale e alla prostata (Schmandt et al., 2011). Una relazione inerente a tale associazione è stata individuata per la prima volta quando l'iperinsulinemia è risultata essere un fattore di rischio non solo per il cancro del colon (Giovannucci, 2007; Jochem and Leitzmann, 2016) ma anche per i 20-33% dei pazienti obesi a rischio di carcinoma mammario, esofageo e renale (Gild et al., 2017; Wolfson et al., 2017; Zheng et al., 2017). Sebbene in questi anni siano stati realizzati grandi passi in avanti in merito al ruolo innescante delle condizioni di obesità nelle varie tipologie di carcinoma, resta ancora

l'identificazione dei fattori ambientali, genetici e molecolari specifici responsabili dei processi infiammatori negli obesi.

### I.4.1 Disturbi cognitivi associati all'obesità

Studi recenti hanno messo in evidenza come il sovrappeso e l'obesità contribuiscano negativamente sull'attività cognitiva attraverso una serie di potenziali meccanismi, tra i quali il metabolismo cerebrale compromesso, l'elevata infiammazione e il degrado neuronale (Stillman et al., 2017). L'assunzione di diete ricche di acidi grassi saturi e di zuccheri raffinati rappresenta, infatti, una delle principali cause di alterazioni mnemoniche in un individuo sano. Diversi studi si sono focalizzati su tale ambito, come si è potuto notare dall'alterata *task memory* e funzionalità dell'HIP riportate in un gruppo di studenti trattato con una dieta ricca in grassi e carboidrati (Francis and Stevenson, 2011). Tali soggetti hanno, infatti, mostrato una ridotta sensibilità dell'HIP, sede della memoria episodica, agli stimoli interni di appetito e sazietà che non consentiva loro di ricordare quello che avevano mangiato in precedenza. Contestualmente questi stessi studenti hanno presentato una predisposizione maggiore verso malattie neurodegenerative come la demenza e AD (Solfrizzi et al., 2011; Fig.I.6). Contrariamente una maggiore assunzione di acidi grassi polinsaturi e un rapporto maggiore di questi rispetto ai saturi è stata associata ad una migliore funzionalità mnemonica e un ridotto rischio di alterazioni cognitive (Eskelinen et al., 2008; Devore et al., 2009).

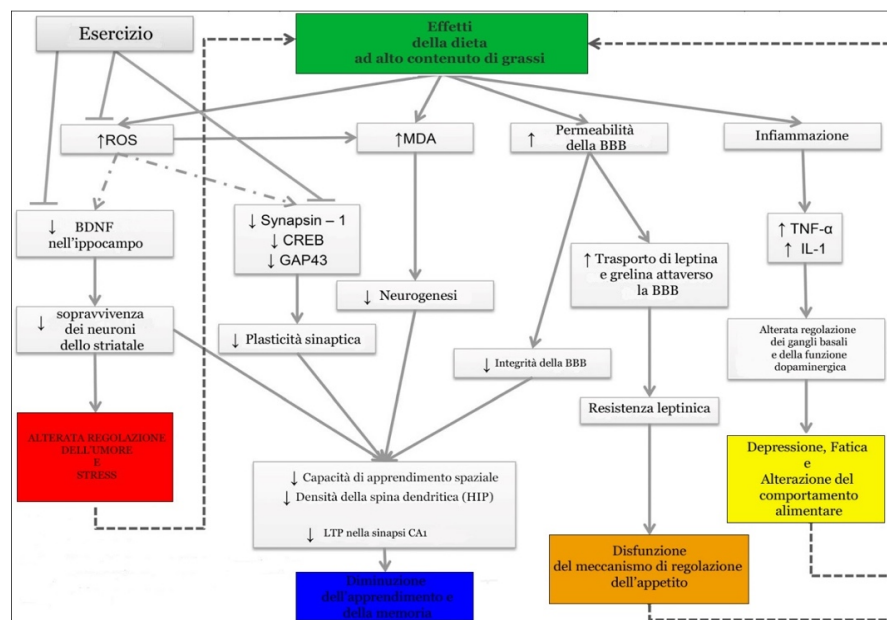


Fig.I.6 Effetti di una dieta HF sulle attività cognitive.

In particolare, una dieta ricca di omega-3 (acidi grassi polinsaturi) rispetto ad omega-6 (grassi saturi) è stata associata ad un rischio più basso di declino cognitivo e di AD rafforzando un ruolo protettivo più mirato esercitato dai grassi polinsaturi (Heude et al., 2003; Swanson et al., 2012). Il consumo di una dieta iperlipidica o ricca di zuccheri è all'origine di cambiamenti centrali e periferici come l'infiammazione la quale potrebbe contribuire alla disfunzione cognitiva in soggetti obesi (Miller and Spencer, 2014). Difatti, il tessuto adiposo in eccesso secerne numerose adipochine che possono modificare il funzionamento dei tessuti vicini, e danneggiare la salute del cervello attraverso processi infiammatori (Xu et al., 2003). I meccanismi infiammatori centrali inducono una neurodegenerazione preferenzialmente a livello dell'HIP e di conseguenza una ridotta funzionalità mnemonica nonché un alto rischio di demenza (Takeda et al., 2014). In linea con queste correlazioni, prove eseguite su un numero cospicuo di volontari (tra 30 e 54 anni) hanno fornito delle indicazioni interessanti da cui si evince che tanto più alti risultano i marcatori specifici dell'infiammazione sistemica periferica (IL-6 e CRP) quanto più basse sono le capacità dell'apprendimento spaziali, le abilità mnemoniche a breve termine, le conoscenze verbali oltre alle ridotte quantità di materia grigia/bianca corticale e volume HIP (Marsland et al., 2015). Recentemente, si è ipotizzato che una particolare alimentazione, nei primi anni di vita, potrebbe essere importante nella programmazione delle funzioni cognitive associate all'obesità (Veronese et al., 2017). Tale condizione patologica potrebbe avere come conseguenza un'infiammazione ipotalamica con microgliosi nel nucleo PVN e un aumento dell'espressione di geni pro-infiammatori a livello ipotalamico (Ziko et al., 2014). Sebbene diversi studi sostengano che gli effetti di una dieta HF in un adulto siano reversibili, almeno nell'HIP, i ratti sottoposti ad *overfeeding*, nelle prime settimane di vita, esibiscono microgliosi ipotalamica associata al rischio di presentare una maggiore predisposizione in età adulta rispetto a coloro i quali assumono una dieta normale nello stesso periodo. Tali modelli, infatti, hanno anche una maggiore risposta immunitaria periferica e centrale nei confronti dell'infiammazione (Clarke et al., 2012; Cai et al., 2015; 2016). Come riportato precedentemente, la resistenza all'insulina costituisce una condizione ad alto rischio non solo per i diabetici ma anche per gli obesi rafforzando l'ipotesi che tale condizione possa compromettere la capacità cognitiva nei pazienti che sviluppano una scarsa sensibilità all'insulina (Heni et al., 2015). Similmente alle condizioni infiammatorie periferiche anche la resistenza all'insulina centrale ha conseguenze negative soprattutto sulle funzioni dipendenti dall'HIP e sulle funzioni esecutive poiché le regioni del cervello che supportano queste attività (ad esempio, i cortici prefrontali temporali e dorsolaterali mediali) hanno elevate

concentrazioni di recettori dell'insulina (Blázquez et al., 2014). Tale ipotesi è stata confermata anche da studi condotti sull'uomo e su modelli animali obesi nei quali le regioni cerebrali essenziali per la memoria, compreso l'HIP e la PFC dorsolaterale, hanno mostrato una ridotta attività funzionale e un grado di resistenza all'insulina elevato (Cheke et al., 2017).

È ormai noto che l'attività fisica apporta una serie di benefici all'organismo e contribuisce a mantenere lo stato di salute di un individuo. A tal scopo è stato dimostrato che quest'ultima può contrastare gli effetti esercitati da una HFD sulla funzionalità cognitiva (Woo et al., 2013). Recenti studi hanno evidenziato che l'esercizio fisico è in grado di aumentare i livelli del *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), di sinapsina 1, di *cAMP response element-binding protein* (CREB), di diminuire i livelli di *reactive oxygen species* (ROS) nell'HIP ed aumentare la *performance* nel *Morris water maze*, un test mnemonico finalizzato alla valutazione dell'abilità mnemonica e dell'apprendimento spaziale sfruttando la naturale avversione dei roditori nei confronti dell'acqua (Lu et al., 2011), indicando un miglioramento dell'attività cognitiva. Anche il controllo esecutivo, che rappresenta tipicamente il primo dominio cognitivo compromesso con l'età, mostra miglioramenti a seguito dell'attività fisica. Ciò suggerisce come l'esercizio fisico è in grado di preservare e perfino migliorare sia *pathway* fisiologici (infiammazione, salute vascolare, segnalazione metabolica) che il funzionamento dei domini cognitivi che presentano disfunzioni a causa dell'obesità e dell'invecchiamento e questo lo potrebbe rendere un fattore particolarmente adatto per alterare il corso della funzionalità cerebrale negli adulti obesi.

#### **I.4.2 Disturbi comportamentali e obesità**

L'obesità è un problema tanto psicologico quanto fisico poiché la base eziologica dei disturbi alimentari e dell'obesità di solito è una combinazione tra fattori psicosociali, ambientali, genetici o biologici. Gli individui che soffrono di disturbi psicologici (ad esempio depressione, ansia e disturbi alimentari) possono avere maggiori difficoltà a controllare l'assunzione di cibo, e nello stesso mantenere un peso sano (Bodenlos et al., 2011; Strigo et al., 2017). Il cibo viene spesso utilizzato come meccanismo di copertura da parte di coloro che hanno problemi di peso, specialmente quando sono tristi, ansiosi, stressati, solitari e frustrati. Infatti, in molti individui obesi sembra esserci un ciclo perpetuo di disturbi dell'umore, di sovraesposizione e di aumento di peso. Esiste, quindi, una stretta relazione tra l'obesità e i disturbi neuropsichiatrici come l'ansia, in particolare il disordine generalizzato dell'ansia, gli attacchi di panico, il disordine da stress post-

traumatico e i disturbi cognitivi (Garipey et al., 2010; André et al., 2014; McCuen-Wurst et al., 2017). Di recente è stato osservato come una HFD, che aveva indotto obesità nei ratti, aveva peggiorato un disturbo cardiovascolare in seguito ad uno stress emotivo (Abreu et al., 2014); il consumo di diete ricche di grassi da parte della madre durante il periodo perinatale aveva causato la comparsa di comportamenti ansiosi nella prole. Anche il passaggio dall'allattamento ad una HFD nel periodo postnatale aveva indotto lo sviluppo di ansia valutata tramite un test ansiometrico comportamentale come l'EPM (Sasaki et al., 2014). Tuttavia, gli effetti dell'obesità sui sistemi cerebrali che portano disturbi ansiosi non sono stati completamente compresi. È stato ampiamente dimostrato che l'HTH dorsomediale (DMH) rappresenta una regione cruciale coinvolta nella regolazione delle risposte comportamentali come la paura, l'ansia e il disturbo da attacco di panico (Nascimento et al., 2014; de Norohna et al., 2017) mentre l'HTH mediale, non solo regola alcuni aspetti del comportamento ma è responsabile di funzioni fisiologiche come l'ingestione del cibo, il metabolismo e la riproduzione (Nascimento et al., 2010). In questo contesto il DMH agisce come un importante substrato neuroanatomico che coordina il comportamento (Fontes et al., 2011) e regola lo stato ansioso mantenendo un equilibrio dovuto a segnali neuronali di tipo eccitatorio (glutammato) ed inibitorio (GABA; de Norohna et al., 2017). È stato osservato che l'iniezione del GABA<sub>A</sub> nel DMH determina un effetto panicolitico osservato nell'EPM ma non varia la risposta di apprendimento relativa all'ansia (Nascimento et al., 2010). In particolare, negli ultimi anni, è stata valutata la relazione tra la reattività cardiaca in seguito ad uno stress emotivo e il tono GABAergico all'interno del DMH nei ratti in cui è stata indotta obesità. L'iniezione dell'agonista GABAergico, muscimolo, nel DMH dei controlli (CTRL) ha regolato la pressione sanguigna mentre l'attività cardiaca è risultata aumentata in seguito allo stress. Contrariamente, nei ratti HFD tale agonista non ha ridotto l'aumento di pressione sanguigna e l'attività cardiaca ma ne ha determinato soltanto un aumento transitorio rispetto ai ratti non trattati (Abreu et al., 2014). Si è ipotizzato che la mancanza di effetti da parte del muscimolo negli animali trattati con HFD sia dovuto all'attenuazione del tono GABAergico all'interno del DMH che potrebbe essere la causa di una risposta eccessiva osservata in seguito all'induzione di uno stimolo che porta ad uno stress emotivo (Abreu et al., 2014; de Norohna et al., 2017). Dal momento che i ratti obesi sembrano essere caratterizzati da una diminuzione del tono GABAergico inibitorio all'interno del DMH e che i suoi cambiamenti funzionali sono correlati a disturbi dell'umore, è stato valutato che gli stessi animali potrebbero essere suscettibili alla comparsa di ansia o attacchi di panico dovuti all'alterazione dell'attività GABAergica all'interno di questo nucleo (de Norohna et al., 2017).

Altre ricerche in questo campo hanno evidenziato, invece, un aspetto che tenta di spiegare la correlazione tra disturbi dell'ansia e l'obesità. Le alterazioni cognitive e psicologiche osservate in modelli DIO (Buettner et al., 2012) sono dovute ad una ridotta espressione di molecole associate al processo di neurogenesi, apprendimento e memoria come il BDNF (Molteni et al., 2002), la DA (Kaczmarczyk et al., 2013) e molecole bioattive infiammatorie (Pistell et al., 2010). Una dieta HF può agire attraverso *pathways* associati ai glucocorticoidi, alla neurogenesi e alla leptina (Valladolid-Acebes et al., 2013; Boitard et al., 2014, 2015, 2016;), e in tal modo questa esposizione può influire negativamente sull'attività cognitiva nell'uomo (Boitard et al., 2016). Difatti, numerosi studi hanno considerato il fenotipo obeso come un fattore predittivo, sia nei bambini che negli adolescenti, nei quali è stato rilevato un maggior rischio di comparsa di deficit cognitivi e una ridotta funzionalità esecutiva nonché una maggiore predisposizione ad alcune complicanze psicologiche come disturbi dell'attenzione, iperattività, impulsività e ansia (Kalarchian and Marcus, 2012; Liang et al., 2014). In tale contesto, è stato dimostrato che l'obesità in queste fasce d'età crea un serio malessere di natura psicologica e disturbi cognitivi che persistono addirittura a lungo termine, in seguito al consumo di HFD e considerato l'incremento notevole di obesità infantile negli ultimi '30 anni (Ogden et al. 2014) e le conseguenze ad esse associate è importante che la ricerca si indirizzi su tale problema al fine di individuare nuove strategie terapeutiche.

### **I.5 Aspetti clinici dell'obesità**

Dal punto di vista diagnostico per determinare se e in che misura un individuo sia obeso, sono stati progettati e sviluppati diversi metodi, tra cui la valutazione basata sull'antropometria, l'analisi dell'impedenza bioelettrica, la densitometria e le metodiche basate sull'immagine. Tuttavia quello più comunemente usato, ma impreciso, resta la BMI. Tale indice, che dovrebbe grossolanamente caratterizzare la condizione dell'adiposità attraverso il sovrappeso e stato di obesità, deriva dal calcolo del peso corporeo dell'individuo (espresso in chilogrammi, kg) diviso per l'altezza in metri al quadrato ( $m^2$ ). La classificazione della World Health Organization (WHO) che utilizza BMI definisce la sottanutrizione come  $<18,5 \text{ kg/m}^2$ , peso normale tra  $18,5-24,9 \text{ kg/m}^2$ , sovrappeso tra  $25-29,9 \text{ kg/m}^2$ , obesità come  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  e obesità estrema  $\geq 40 \text{ kg/m}^2$  (Fig.I.7).

La distribuzione del grasso corporeo è considerata un'alterazione fisica che presente un'altrettanto rischio per la salute.

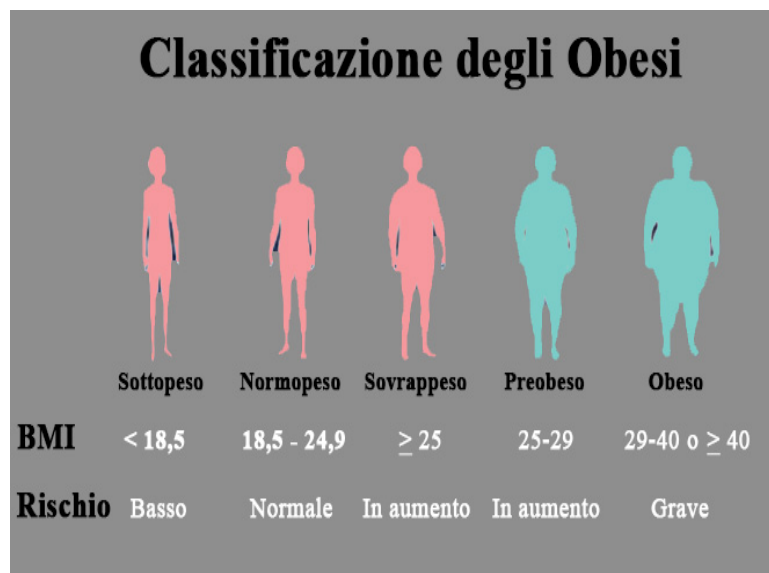


Fig.I.7 Classificazione di soggetti adulti in base al BMI.

Difatti, l'obesità localizzata sulle parti superiori del corpo ('viscerale', 'maschile', 'sopra la cintura') è fortemente associata ad un più alto rischio di malattie metaboliche croniche associate all'obesità, rispetto all'obesità del corpo inferiore ('subcutaneo', 'femminile', 'sotto la cintura'; Baltadjiev et al., 2014; Serra et al., 2015; Han et al., 2017).

Il successo nel trattamento dell'obesità dipende dall'entità della perdita di peso e della riduzione delle comorbilità associate al tale patologia all'inizio del trattamento. Un intervento terapeutico per la perdita di peso è efficace quando c'è una riduzione maggiore o uguale all'1% del peso corporeo al mese, raggiungendo almeno il 5% in 3 o 6 mesi. In particolare, un decremento dal 5 al 10% del peso riduce i fattori di rischio per il diabete e le malattie cardiovascolari. Il trattamento dell'obesità si basa sugli interventi di modifica dello stile di vita, del comportamento, nella scelta della dieta e aumentando l'attività fisica. Tuttavia, il numero di pazienti che ottengono risultati soddisfacenti con misure non farmacologiche è molto basso. La maggior parte dei trattamenti alimentari dell'obesità comportano la riduzione dell'assunzione di calorie, utilizzando alimenti a basso contenuto di grassi e ricchi di fibre. Anche se sembra semplice la maggior parte dei pazienti presenta difficoltà di mantenimento a lungo termine. Tuttavia, l'esercizio fisico è una strategia importante per la prevenzione dell'obesità, in quanto garantisce la perdita di peso e aumenta, attraverso esercizi di resistenza, la massa corporea magra (Hills et al., 2011). Un ulteriore trattamento per l'anti-obesità è l'analisi dello stato cognitivo-comportamentale del paziente, allo scopo di controllare lo stimolo alimentare, quando viene innescata l'assunzione precoce di cibo,



nonché di valutare e regolare le motivazioni del paziente e le cause alla base di tale disordine metabolico (Eichen et al., 2017). Sebbene negli ultimi dieci anni, la ricerca abbia cercato di creare farmaci sofisticati in grado di contrastare l'eccesso di grasso, riducendo al minimo gli effetti collaterali soprattutto nei soggetti cardiopatici e diabetici, intervenendo anche chirurgicamente nelle situazioni ad alto rischio di mortalità, la quasi totalità di queste molecole non è stata approvata dalla *Food and Drug Administration* (FDA) ed è ancora in fase di sperimentazione. La conseguenza più grande, tuttavia, è l'impatto che la mancanza di opzioni di trattamento sta provocando sul popolo americano e sulla popolazione mondiale. Più di un terzo degli adulti americani è obeso e vulnerabile alle devastanti conseguenze dell'obesità, e il numero crescente è gravemente colpito e senza opzioni di trattamento. Il recente ritiro dei farmaci dal mercato, così come la limitata efficacia e i numerosi effetti negativi, costituiscono una serie di motivi che starebbero rallentando lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento dell'obesità. Emerge quindi la necessità di nuove terapie per monitorare la progressione dell'epidemia di obesità (Barber et al., 2010; Santini and Novellino, 2017) e tra queste nuove possibilità, i prodotti naturali occupano un'area di ricerca attiva in grado di promuovere la perdita di peso senza danneggiare la salute umana già di per sé compromessa.

## **I.6 Nuovi approcci terapeutici nella cura dell'obesità: le sostanze naturali**

Molti prodotti naturali mostrano una migliore attività contro l'obesità quando sono associati ad una dieta equilibrata e all'utilizzo di farmaci allopatici. Difatti, l'effetto combinato tra farmaci a base di erbe e prodotti naturali sta aumentando la propria offerta sul mercato, grazie ad una minore tossicità, oltre a una maggiore applicabilità per i futuri farmaci contro l'obesità. Diversi prodotti naturali hanno un'attività ipolipemizzante, in grado di riequilibrare l'assetto lipidico, osservabile sia nei prodotti derivati da piante che di origine animale. Al fine di ridurre il rischio di morbilità e mortalità, uno degli effetti principali che è stato studiato nei prodotti naturali, è l'effetto termogenico di diversi composti naturali potenziali come la caffeina, l'efedrina, l'efedra, la capsaicina e le catechine presenti nel tè verde che, nel caso di quest'ultimo potrebbe risultare efficace contro l'obesità attraverso il controllo dei livelli della leptina e della grelina (Haghighatdoost et al., 2018) mentre la capsaicina potrebbero migliorare le condizioni di obesità attraverso alti livelli di IL-1 e IL-6 (Marics et al., 2017) oppure mediante una *down-regulation* dei siti glutammatergici (Huang et al., 2017).

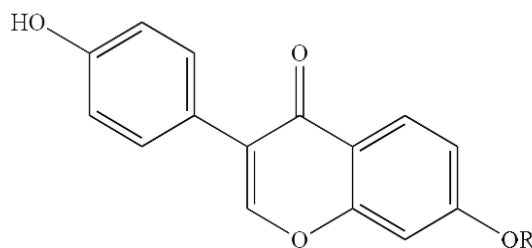
La termogenesi è l'energia generata sotto forma di calore nel tessuto vivente, valutata come la somma totale del calore generato in uno stato di riposo, di digiuno (12 ore) e a temperatura ambiente (Kumahara et al., 2011) e direttamente proporzionale al tasso di metabolismo basale (Granata and Brandon, 2002). Per ottenere un risultato termogenico attraverso la dieta, sono stati condotti studi con prodotti naturali commestibili che hanno tale effetto. Alcuni di questi sono considerati molto importanti: l'aceto rosso, lo zenzero, gli spinaci, il broccolo, l'arancio, la caffeina, olio di lino, i grassi vegetali, l'olio di cocco e prodotti del cacao che hanno la capacità di aumentare la temperatura corporea accelerando il metabolismo e conseguentemente bruciare il grasso. Oltre all'effetto termogenico, numerosi studi mostrano che un'ampia varietà di piante e di altri prodotti derivati da animali come la *Garcinia cambogia* Roxb., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze - Tè verde, *Panax ginseng*, *Phaseolus vulgaris* L., *Caralluma fimbriata* Muro, *Citrus aurantium* L., *Ephedra sinica* Stapf., *Fucus vesiculosus* L., *Rhamnus purshiana*, *Chitosan*, *Orlistat*, capsaicina hanno un'attività positiva sull'effetto ipolipidemico (de Figueiredo et al., 2015). Tuttavia, un nuovo paradigma nel trattamento dell'obesità è l'elevata ingestione di alimenti derivati dalle piante, a causa della loro quantità di vitamine, proteine, minerali e composti bioattivi, essenziali per il mantenimento della salute. I diversi composti naturali, inoltre, si sono mostrati efficaci non solo nella termogenesi ma anche nella differenziazione degli adipociti. Numerosi studi epidemiologici, clinici e sperimentali hanno suggerito che il consumo di una dieta ricca di antiossidanti è importante per mantenere la salute umana e ridurre il rischio di malattie croniche (Dal Negro and Visconti, 2016; Ahmet et al., 2017). I composti fenolici che troviamo nella frutta e nella verdura potrebbero essere efficaci per prevenire diverse malattie neurodegenerative come l'AD e per correggere l'indice lipemico, attraverso l'abbassamento del colesterolo e dei TRIG (Angeloni et al., 2017). L'epigallocatechina gallato è un importante polifenolo presente nel tè verde che regola vari enzimi coinvolti nel catabolismo lipidico e nell'anabolismo, come ad esempio l'acetil-CoA-carbossilasi, l'acido grasso sintetasi, la lipasi pancreatica, la lipoproteina gastrica, la lipoossigenasi lipoproteina, proteggendo le cellule dai danni provocati dai radicali liberi e favorendo una corretta ossidazione dei lipidi. Gli studi sull'uomo mostrano, inoltre, che il consumo di tè verde aumenta del 4% le spese energetiche per la termogenesi probabilmente attraverso una distinta azione della caffeina e delle catechine (Türközü and Tek, 2017). Anche la *Garcinia cambogia* una pianta esotica originaria dell'Asia sudorientale (India e Indonesia) e dell'Africa centrale, grazie al suo costituente principale l'acido idrossicitrico è in grado di accelerare la termogenesi e ridurre il grasso corporeo (Hayamizu et al., 2003). Essa promuove l'ossidazione degli acidi grassi, aumentando il rilascio della serotonina

(5-HT<sub>2A</sub>) e diminuendo la concentrazione di leptina nel siero umano (de Figueiredo et al., 2015). L'acido idrossicitrico, inoltre, ha anche un effetto anoressigenico, causando una ridotta assunzione di cibo (Dornas et al., 2009). Similmente anche le antocianine presenti nei frutti rossi e blu oltre ad avere una potente azione antiossidante, somministrate insieme a diete ipercaloriche riducono significativamente l'accumulo di grasso nei topi, contrastando l'insorgenza di patologie metaboliche associate a disturbi cardiovascolari (Mykkänen et al., 2014). Negli ultimi decenni, anche gli isoflavoni di soia hanno ricevuto un'attenzione rilevante a seguito del cosiddetto "fenomeno giapponese" legato ad una minore incidenza di malattie croniche specifiche nei giapponesi rispetto alla popolazione occidentale dovuta ad una maggiore assunzione di cibi di soia dalla vita precoce (Watanabe et al., 2002; Korde et al., 2004; Korde et al., 2009). Essi fanno parte dei fitoestrogeni, un gruppo di sostanze vegetali biologicamente attive con una struttura chimica simile a quella dell'estradiolo, un estrogeno endogeno coinvolto sia nello sviluppo cerebrale che nel mantenimento della normale funzionalità cerebrale in età adulta. Gli isoflavonoidi più numerosi sono principalmente prodotti dalle piante leguminose, come la soia e il trifoglio rosso, che hanno azioni estrogeniche o anti-estrogeniche. L'uso di queste sostanze naturali è ampiamente diffuso, non solo nel campo della medicina come terapia ormonale sostitutiva nelle donne, ma anche come utilizzo di integratori alimentari utili e sufficienti a soddisfare le necessità quotidiane nutrizionali. I fitoestrogeni della soia sono spesso utilizzati anche per la loro facilità di coltivazione e per il loro basso costo. Recentemente, in molti paesi asiatici, tra cui il Giappone, una grande quantità di soia e i prodotti derivanti dalla sua trasformazione vengono consumati per lo svezzamento alimentare e il foraggio animale in quanto buone fonti di proteine. Molte evidenze hanno sottolineato, inoltre, il loro ruolo benefico nella prevenzione di alcune patologie grazie agli effetti positivi sull'abbassamento del colesterolo e dei TRIG ematici, sulla diminuzione dell'adiposità e sul controllo dell'insulino-resistenza (Cavallini et al., 2016; Simental-Mendia et al., 2017). Altri studi hanno evidenziato come una dieta sostitutiva a base di fitoestrogeni conduca ad un miglioramento del metabolismo del glucosio e ad una significativa riduzione della resistenza all'insulina sia in donne in menopausa e post-menopausa che in modelli sperimentali affetti da gravi disordini alimentari (Bhathena and Velasquez, 2002, Cederroth and Nef, 2009, Jungbauer and Medjakovic, 2014). Queste indicazioni hanno fortemente messo in evidenza che le azioni neuroprotettive encefaliche da parte degli isoflavonoidi (in cui il DZ e la genisteina sono maggiormente presenti nel cibo) vengono attuate attraverso i recettori degli estrogeni (ER<sub>S</sub>) influenzando non solo il

comportamento emotivo ma soprattutto i processi di differenziazione del cervello durante i periodi peri- e post-natale (Yu et al., 2013; Liu et al., 2016; Park and Ko, 2016).

### I.6.1 Daidzein

Tra le varie classi di isoflavoni (xenoestrogeni naturali), che includono genisteina, gliciteina, biocanina A, formononetina ed altri, il mio interesse è stato rivolto al DZ (7,4'-diidrosiisoflavone), un composto fitochimico, appartenente alla classe dei polifenoli come fitoestrogeno, poiché mostra un'elevata attività estrogenica (E). Questo isoflavone si trova prevalentemente nel trifoglio rosso, nell'alfa alfa, nella soia e alcuni tipi di legumi oltre che nella *Pueraria tuberosa*, una pianta rampicante utilizzata come agente medicinale vitale ad azione neuroprotettiva e anti-tumore. Questo fitoestrogeno mostra ampie attività biologiche, agisce come antiossidante, cardioprotettivo (Kim et al., 2009), antinfiammatorio (Chan, 2001) ed è in grado di proteggere contro importanti forme tumorali come il cancro alla prostata e i tumori intestinali. L'interesse nei confronti di questa sostanza naturale e l'utilizzo della stessa per il trattamento di disturbi che interessano il SN, è aumentato da quando è stata constatata la somiglianza strutturale e funzionale dei fitoestrogeni, compreso il DZ, con gli estrogeni umani, in particolare con l'estradiolo. Strutturalmente condivide un anello di benzene collegato ad un cromone o ad un 4-cromanone. Mentre nella maggior parte dei flavonoidi l'anello B si lega all'anello C attraverso il carbonio 2, negli isoflavoni questo legame avviene attraverso il carbonio 3. Tuttavia, una caratteristica significativa della struttura chimica del DZ è la presenza di un anello fenolico, che permette il legame al recettore per gli estrogeni e che gli conferisce proprietà pseudormonali (Ahmed et al., 2017; Fig.I.8).



R=H: Daidzein  
 R=COCH<sub>3</sub>: 6'-O-acetyldaidzein  
 R=COCH<sub>2</sub>COOH: 6'-O-malonyldaidzein

Fig.I.8 Rappresentazione strutturale del DZ.

I benefici spesso ascritti alla soia e ai cibi a base di quest'ultima si ritiene derivino dalla capacità degli isoflavoni presenti di agire come fitoestrogeni. In tali alimenti sono presenti in quattro forme: O-glicoside, daidzin (7-O- glucoside), 6''-O-acetildaidzein, 6''-O-malonildaidzin, anche se la forma bioattiva è rappresentata dall'isoflavone privo dello zucchero, ovvero l'aglicone.

Pertanto, gli isoflavoni naturali della soia devono essere attivati, tramite l'idrolisi del gruppo glucosidico (ovvero la separazione del gruppo glucosidico), per acquisire la loro funzionalità biologica. Difatti, dopo il consumo della soia, l'isoflavone O-glicoside viene idrolizzato a daidzein il quale a sua volta viene ulteriormente metabolizzato attraverso i processi di demetilazione e riduzione da parte di batteri intestinali sotto forma dei seguenti metaboliti: O-desmetilangolensina (O-DMA,2',4',4 "trihydroxy- $\alpha$ -metildeoxybenzoin), dihydrodaidzein (4',7-dihydroxyisoflavanone) e cis-4-OH-equol (4',7-dihydroxyisoflavan-4-ol). Gli isoflavoni agliconi vengono assorbiti per diffusione passiva nell'intestino tenue, raggiungendo il loro livello più elevato nel sangue un'ora dopo l'ingestione manifestando anche un'elevata capacità di attraversare la placenta. Inoltre, la sua concentrazione può essere determinata nel latte materno (Jochum et al., 2017). Successivamente, questi composti vengono trasportati dal sangue al fegato, dove il sistema enzimatico microsomiale è responsabile della formazione di metaboliti più idrofilici che vengono eliminati con l'urina.

Uno dei principali metaboliti del DZ è l'equolo, un composto diidrossifenolico che presenta caratteristiche simili all'estradiolo e ha una maggiore attività estrogenica rispetto al DZ. L'equolo si forma dopo idrolisi intestinale dell'isoflavone e successiva biotrasformazione da parte della flora batterica del colon, non si tratta quindi di una molecola di origine vegetale perché è prodotta esclusivamente dal metabolismo batterico intestinale (Atkinson et al., 2005; Mathey et al., 2006). La trasformazione della molecola in questo metabolita è legata al tipo di microflora, al tempo di transito intestinale e al pH, tutti fattori che possono essere influenzati da farmaci assunti, da interventi chirurgici, dalla dieta o da malattie intestinali. Il fatto che non tutti gli individui siano in grado di produrre equolo nelle stesse quantità spiega la variabilità che si osserva nei dati ottenuti, in studi clinici, sui benefici della soia (Setchell et al., 2002). Soprattutto nei roditori tale metabolita viene prodotto in grande quantità (70-90% di tutti gli isoflavoni circolanti) e, contrariamente all'uomo, in maniera indipendente dal sesso (Soukup et al., 2016). Di conseguenza, quando questi animali vengono alimentati con una dieta ricca di soia, la mimica estrogenica può avere delle profonde influenze sui parametri comportamentali e neuroendocrini (Patisaul et al., 2012). Nell'uomo, invece, la concentrazione dell'equolo è relativamente bassa in quanto solo il 30% degli esseri umani consumano alimenti che contengono soia (Setchell et al., 2002). Dati ulteriormente

confermati da studi su popolazioni di paesi occidentali nei quali è stato rilevato che solo il 25-30% della popolazione adulta produce equolo dopo aver mangiato alimenti a base di soia contenenti isoflavoni, risultati significativamente inferiori rispetto a quelli riportati (50-60%) negli adulti dei paesi asiatici o nei vegetariani occidentali. Tuttavia, la somministrazione di equolo e di altri isoflavoni modula l'attività cerebrale riducendo l'incidenza di patologie neurodegenerative come AD, influenzando positivamente sulla cognizione delle donne in postmenopausa (Goodman-Gruen and Kritz-Silverstein, 2003) e negli uomini (File et al., 2001) e riducendo i sintomi depressivi (Blake et al., 2011).

### **I.6.1.1 Recettori dei fitoestrogeni e il loro meccanismo d'azione**

Gli isoflavoni, essendo analoghi al  $17\beta$  estradiolo, mediano i loro effetti biologici attraverso il legame con i ERs per il quale esistono due tipi di recettori nucleari: ER $\alpha$  ed ER $\beta$ . Queste due isoforme sono codificate da geni diversi: uno localizzato sul cromosoma 6 codifica per ER $\alpha$  e l'altro localizzato sul cromosoma 14 codifica per ER $\beta$ . Entrambi condividono le caratteristiche strutturali tipiche dei recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari (Farzaneh and Zarghi, 2016). Come tutti i recettori nucleari possiedono:

- Dominio N-terminale conosciuto anche come A/B domain che conferisce immunogenicità e modula la trascrizione in maniera specifica al tessuto e al gene attraverso la cosiddetta *Activation Function-1* (AF-1);
- *DNA Binding Domain* ovvero un dominio di legame al DNA, altamente conservato, costituito da due strutture *zinc finger* funzionalmente distinte, attraverso le quali il recettore interagisce fisicamente con l'elica del DNA;
- *Ligand Binding Domain*, il dominio E di legame con il ligando caratterizzato al suo interno da un dominio AF-2 coinvolto nella trascrizione ligando-dipendente;
- Dominio D conosciuto anche come regione cerniera in quanto collega il dominio C al dominio E;
- Dominio F o dominio C-terminale del recettore.

I recettori nucleari agiscono come regolatori positivi o negativi dell'espressione genica. Difatti, in seguito all'attivazione, e quindi al legame con il proprio ligando, vanno incontro ad una

modificazione conformazionale strutturale che provoca la dissociazione delle *Heat Shock Protein*, la dimerizzazione del recettore e la successiva traslocazione dal citosol al nucleo. In particolare, la trascrizione dei geni viene regolata attraverso il legame del recettore a specifiche sequenze di DNA presenti all'interno dei geni bersaglio, sequenze che vengono chiamate elementi di risposta agli estrogeni (ERE). L'attività trascrizionale dei due ER dipende dalla loro capacità di reclutare coattivatori o corepressori, che regolano in maniera contrapposta l'assemblaggio del complesso di pre-trascrizione. Tuttavia, è stato dimostrato che circa 1/3 dei geni nell'uomo, regolati da ER, non contengono gli elementi ERE (O'Lone et al., 2004) e ciò porterebbe ad ipotizzare la presenza di un meccanismo alternativo alla base di tale processo. Un altro dato importante è che in alcuni casi gli estrogeni possono indurre delle risposte cellulari rapide, che non hanno il tempo di poter essere mediate da proteine trascritte e sintetizzate *ex novo*, in seguito al legame con i recettori intracellulari. L'azione rapida detta anche "non genomica" viene esplicitata attraverso il legame a recettori localizzati a livello della membrana plasmatica come ad esempio i recettori steroidei, le proteine di membrana che possiedono un dominio di legame per gli steroidi e i recettori accoppiati alle proteine G. È stato dimostrato, inoltre, che il 5-10% dei ER $\alpha$  non solo sono presenti a livello della membrana plasmatica ma sono direttamente responsabili della risposta rapida (Pedram et al., 2006; Canonaco et al., 2008). Questi effetti rapidi a loro volta possono interferire e modulare quelli indotti da recettori intracellulari e quindi "genomici", coinvolgendo sia segnali intermedi che presenti a valle della cascata di trasduzione del segnale. Alcuni studi hanno evidenziato che i recettori di membrana possiedono dei domini in grado di legare delle proteine denominate caveoline, localizzate a livello delle invaginazioni della membrana plasmatica, che interagendo con le molecole della via di trasduzione del segnale, ne innescano l'attivazione. Il fatto che le molecole di segnalazione vengono riunite all'interno di uno spazio limitato consente, una volta legato il recettore, di modulare diverse risposte cellulari.

Il DZ come la genisteina sono in grado di modulare il *pathway* delle tirosine chinasi, del fosfoinositol 3-chinasi (PI3 chinasi), la proteina chinasi C (PKC) e le proteine chinasi attivate da mitogeno (MAP chinasi; Fig.I.9). L'insieme delle molecole coinvolte in queste vie di segnalazione modulano l'attività di fattori di trascrizione diversi, come il *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B) o il CREB, innescando una vasta gamma di risposte cellulari come la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la sintesi di fattori di crescita come le neurotrofine e la produzione di molecole infiammatorie come l'ossido nitrico sintasi (NOS), le citochine e le cicloossigenasi 2 (COX-2). Nel momento in cui gli isoflavonoidi legano direttamente le proteine

chinasi all'interno di queste cascate, ne modulano lo stato di fosforilazione interferendo e modificando la loro attività e l'evoluzione del percorso di segnalazione.

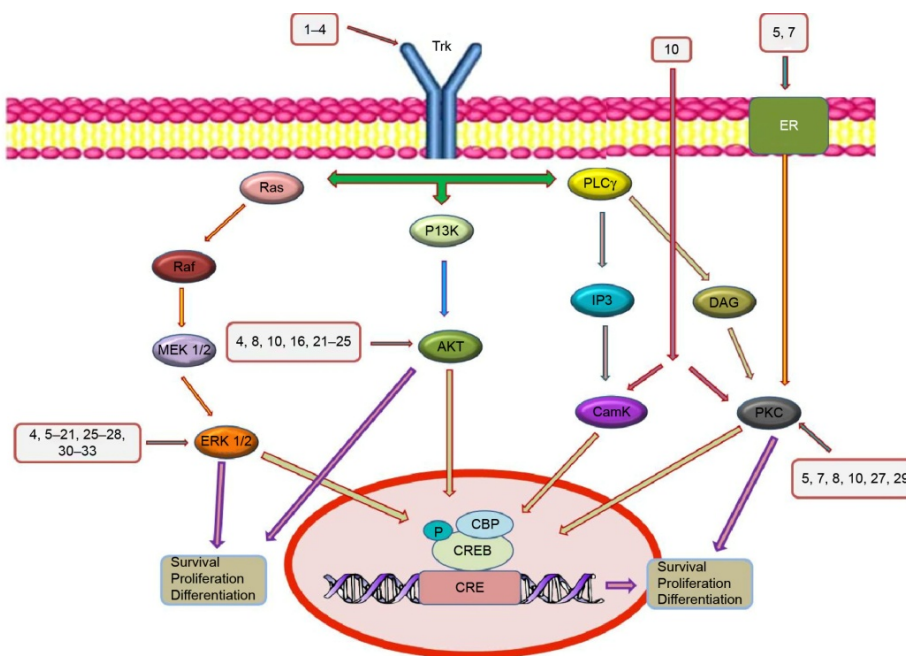


Fig.I.9 Principali vie di segnalazione che mediano gli effetti neurotrofici di vari polifenoli.

L'iperattività o un'alterazione all'interno di queste vie è causa della patogenesi di malattie infiammatorie, cardiovascolari, neurodegenerative e nelle neoplasie (Spencer et al., 2012).

Di notevole curiosità è l'elevata affinità ai siti estrogenici che risulta essere maggiore rispetto agli altri isoflavoni (Chandsawangbhuwana and Baker, 2014; Lu et al., 2014) e tale proprietà suggerisce, ulteriormente una vasta partecipazione ai meccanismi neuro molecolari in cui sono responsabili entrambi i recettori estrogenici. Gli isoflavoni presentano un'affinità di legame per ER $\beta$  significativamente superiore rispetto a quella di ER $\alpha$ . In particolare, il DZ possiede un'attività estrogenica debole rispetto a quella del 17 $\beta$  estradiolo e si lega, soprattutto, all'isoforma ER $\beta$  (Setchell et al., 2005). L'esposizione cronica agli isoflavoni dietetici, inoltre, può modificare l'espressione di ER nei tessuti riproduttivi tra cui le ovaie. Difatti, studi recenti hanno mostrato come il trattamento dietetico con il DZ diminuisce l'espressione del mRNA di entrambe le isoforme recettoriali ER $\alpha$  e ER $\beta$  nelle ovaie del topo (Kaludjerovic et al., 2012) e solo l'espressione di mRNA di ER $\beta$  nell' HTH del porcino.



## I.6.2 Effetti del DZ nel SNC

Il DZ, grazie alla sua struttura fitoestrogenica, è in grado influenzare vari meccanismi di regolazione neurobiologica come il comportamento, la cognizione, la crescita, lo sviluppo e la riproduzione (Yu et al., 2010; Loutchanwood et al., 2014; Gleason et al., 2015). È stato recentemente dimostrato che questo isoflavone agisce direttamente contro varie condizioni neuropatologiche principalmente per la sua interazione con il sistema cerebrovascolare. Difatti, il DZ rispetto ad altre sostanze naturali può penetrare rapidamente nel cervello attraverso la barriera ematoencefalica (BBB), ed è facilmente rilevabile in alcune aree cerebrali come l'HIP, la corteccia, l'HTH, lo striato, il tronco encefalico ed il cervelletto (Zhang et al., 2016) nella prima ora di somministrazione (Xiao et al., 2016). Esso, insieme ad altri polifenoli avendo azione estrogenica ed antiestrogenica (Turner et al., 2007) è in grado di aumentare la sopravvivenza neuronale e promuovere la crescita e la neuroplasticità (Sharma et al., 2015) aumentando l'espressione di alcuni enzimi chiave dei recettori neuronali come la colina acetiltransferasi e delle neurotrofine nella corteccia frontale e nell'HIP (Heo et al., 2006), esplicano azioni pro-differenziazione neuronale al punto che sono stati avanzati ruoli neuroprotettivi di questo isoflavone (Moosavi et al., 2016). L'esposizione al DZ a basse concentrazioni (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) inibisce gli effetti pro-apoptotici e neurotossici causati dal trattamento con il glutammato in tessuti HIP e neocorticali (Yamada et al., 2016; Liu et al., 2017). Si è scoperto, infatti, che i fitoestrogeni possono esercitare i loro effetti attraverso un nuovo recettore extracellulare accoppiato alle proteine G 30 (GPR30) e al ER $\beta$  (Asokan et al., 2017). Simili effetti neuroprotettivi, sono stati riscontrati sempre *in vitro* su cellule neuronali PC12, nelle quali la presenza del DZ ha ostacolato l'aggregazione di A $\beta$  e la citotossicità indotta da A $\beta$ , confermando l'ipotesi che i flavonoidi possono servire come potenziali candidati per il trattamento della malattia dell'AD (Bakhtiari et al., 2017). Gli effetti neuroprotettivi del DZ sono stati valutati anche *in vivo* su alcuni modelli sperimentali importanti come l'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO), in cui topi alimentati con una dieta ricca di soia (con DZ e i suoi metaboliti) hanno mostrato una significativa riduzione del danno ischemico, un miglioramento dello stato neurologico complessivo e un ridotto stress anti-ossidativo (Burguete et al., 2006; Ma et al., 2010) suggerendo che il DZ può garantire applicazione terapeutiche contro l'ischemia cerebrale.

Discordante è invece il ruolo del DZ in relazione allo stato comportamentale e cognitivo come indicato da ratti alimentati con una dieta a base di genisteina e DZ, hanno esibito azioni

ansioгенiche e iperattive sia durante le interazioni sociali sia se sottoposti a test ansiometrici come l'EPM. Al contrario, uno studio condotto su topi ovariectomizzati, ha mostrato un effetto positivo dell'isoflavone di soia sulla funzione mnemonica inizialmente compromessa a seguito di tale operazione (Neese et al., 2014; Khodamoradi et al., 2016). L'ovariectomia ha indotto, negli animali, un calo di apprendimento e una ridotta memoria spaziale nel test mnemonico del labirinto ad acqua di Morris, avendo impiegato più tempo a orientarsi rispetto ai controlli. Tuttavia, la somministrazione a lungo termine di una dieta a base di isoflavoni di soia nei topi ha inibito tale effetto, migliorando significativamente la loro abilità cognitiva. In maniera simile anche l'esposizione del DZ nel periodo perinatale su topi maschi adulti ha influito negativamente sul loro comportamento sociale e sull'ansia mostrando livelli significativi di aggressività e ridotta attività esplorativa, mentre dal punto di vista mnemonico l'isoflavone ha portato ad una migliore abilità cognitiva e di apprendimento spaziale oltre a miglioramenti nelle interazioni sociali (Zeng et al., 2010). È stato, inoltre, rilevato un notevole incremento dei livelli di espressione centrale di ER $\alpha$  (Yu et al., 2013) suggerendo come i complicati effetti biologici, probabilmente sono mediati attraverso i recettori ormonali. Negli ultimi anni l'attenzione degli studiosi si è focalizzata sul ruolo degli isoflavoni nella prevenzione e nella cura dei disordini metabolici. È stato interessante notare come la somministrazione di DZ con la dieta diminuisca l'assunzione di cibo nelle femmine di ratto, sviluppando anoressia attraverso la soppressione dei livelli di mRNA del NPY e della galanina (un neuropeptide con funzioni specifiche sconosciute) e l'aumento dei livelli mRNA della CRH nell'HTH (Fujitani et al., 2015). Un altro studio condotto su topi obesi alimentati con HFD ha mostrato come la somministrazione di una miscela di isoflavoni, quali il DZ e la glicitina, abbia influito positivamente sulla salute dei modelli sperimentali portando ad una significativa riduzione del loro peso corporeo e del tessuto adiposo (Crespillo et al., 2011). Similmente il DZ insieme alla puerarina, estratti da *Pueraria lobata*, ha effetti inibitori anche sull'assunzione volontaria di alcool quando somministrati per via orale, aumentando la possibilità che altri costituenti di piante commestibili possano esercitare azioni simili e più potenti. Uno degli effetti sicuramente più riconosciuto alle sostanze naturali è quello antiossidante capace di bilanciare gli effetti dannosi dei processi di ossidazione che avvengono nell'organismo. A tal proposito, è stato preso in considerazione se il consumo a lungo termine di fitoestrogeni alimentari antiossidanti come la genisteina e il DZ potesse ridurre il rischio di glioma nell'adulto. In questo caso è stato osservato un effetto inibitorio da parte degli isoflavoni sull'ossidazione della lipoproteina a bassa densità. Di conseguenza l'interazione tra il DZ ed ER $\beta$  ha portato ad una diminuzione dell'espressione di iNOS

e COX-2, entrambi i quali manifestano ruoli pro-infiammatori (Mizutani et al., 2000; Ma et al., 2010). Recentemente l'attenzione dei ricercatori è stata rivolta al ruolo anti-tumorale di questo isoflavone. Da alcune indagini è emerso che DZ è in grado di esercitare un tale ruolo sul carcinoma prostatico probabilmente mediante l'arresto delle cellule nella fase G2/M e/o attraverso la riduzione della ciclina B1 e CDK1 che sono responsabili per l'avanzamento del ciclo tumorale (Lu et al., 2016). Sebbene questi siano i primi tentativi per analizzare un ruolo altamente importante, dai primi risultati, oltre a fornire ulteriori ed interessanti indicazioni relative ai meccanismi molecolari, si può cominciare a proporre il DZ ed i suoi analoghi come terapia alternativa per curare le malattie tumorali.

# CAPITOLO II

A livello dei complessi molecolari encefalici, precedenti ricerche avevano evidenziato una stretta interazione degli isoflavoni con alcuni sistemi neuronali ponendo l'accento su un possibile legame tra i fitoestrogeni e la regolazione d'azione dei processi di neurotrasmissione. È ormai noto che gli isoflavonoidi sono in grado di controllare le azioni estrogeniche benefiche attraverso i loro legami con i siti ER $\alpha/\beta$  e poiché i derivati fitoestrogenici trovano sempre più spazi negli alimenti dei bambini sarebbe importante capire il tipo di meccanismo d'azione esplicito da tale interazione (Ponti et al., 2017). Infatti, i risultati di questi lavori hanno rilevato delle azioni favorevoli in quanto la somministrazione della genisteina, durante le prime fasi di sviluppo hanno migliorato la produzione dell'ossido nitrico sintetasi e delle fibre vasopressinergiche responsabili di diverse condizioni omeostatiche. Il suo ruolo specifico su siti neurorecettoriali encefalici non dovrebbe sorprenderci in quanto sia la genisteina che il DZ hanno fornito indicazioni confortanti relative alla loro capacità di bloccare il flusso di Na<sup>+</sup> attraverso i siti glutammatergici voltaggio-sensitivi (Ma et al., 2016). In tal contesto gli isoflavonoidi stanno cominciando ad attrarre sempre di più attenzione attraverso la loro inclusione nei protocolli di trattamento dei dolori viscerali legati alle interferenze midollari o ai fenomeni ischemici, allievando tali disturbi probabilmente mediante la partecipazione di specifici recettori glutammatergici quale NR2B (Zhang et al., 2011; Luo et al., 2014). Attualmente si è cercato di valutare l'applicazione terapeutica del DZ attraverso una sua interazione con dei sistemi neurorecettoriali mirati al miglioramento dei disordini metabolici ed in questa categoria la NT per la sua ampia distribuzione encefalica e nei tessuti periferici oltre a svolgere un doppio ruolo di neurotrasmettitore o neuromodulatore si propone come una delle più promettenti vie neuronali.

## **II.1 Il sistema NTergico**

Questo sistema neuronale è in grado di regolare una vasta gamma di attività biologiche quali l'appetito, la nocicezione, la termoregolazione, la secrezione degli ormoni ipofisari e la motilità intestinale. L'identificazione di una sua forte interazione tra NT e il sistema DAergico (Tyler-McMahon et al., 2000) ha indicato NT come un neurolettico endogeno coinvolto in varie malattie cerebrali come Huntington, PD e la schizofrenia. A livello periferico, invece, la NT è un modulatore paracrino ed endocrino del tratto digerente e del sistema cardiovascolare dei mammiferi in grado di regolare l'assunzione dei nutrienti, la motilità e la secrezione (Kalafatakis and Triantafyllou, 2011) oltre ad essere un importante fattore di crescita su una varietà di cellule normali o tumorali.

La NT viene sintetizzata da un precursore di maggiori dimensioni che contiene anche la neuromedina (NN), un peptide simile alla NT di 6 aa (St-Gelais et al., 2006). NT e NN si trovano nel dominio C-terminale del precursore (pro-NT/NN; Fig.II.1), dove sono affiancati e separate da tre sequenze Lys-Arg mentre una quarta sequenza dibasica che precede una sequenza simile a NN è presente nel dominio N-terminale. Sia la NT che la NN vengono rilasciate a seguito della depolarizzazione dei tessuti cerebrali mentre le forme intestinali vengono immesse in circolo dopo l'assunzione di cibo. Il processamento di tale precursore risulta essere mediato dai membri della famiglia dei pro-ormoni convertasi (PC; St-Gelais et al., 2006).

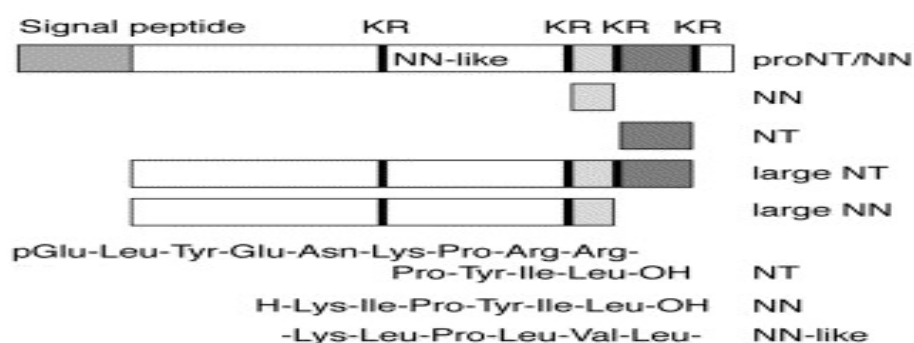


Fig.II.1 Rappresentazione del precursore NT/NN.

Tra di essi, il principale pro-ormone convertasi (PC) coinvolto è il PC2 a causa della maggiore espressione in tutte le regioni immunoreattive per la NT (Villeneuve et al., 2002). Sebbene l'espressione di PC1 e PC5A nel cervello sia più limitata, questi enzimi endoproteolitici hanno, comunque, la capacità di processare il precursore NT/NN e possono contribuire alla sintesi di entrambi i neuropeptidi presenti in diverse aree cerebrali. A seguito dell'attivazione del peptide, la NT viene immagazzinata all'interno di vescicole nucleari e successivamente rilasciata tramite un meccanismo calcio-dipendente. La trasmissione della NT termina con il taglio, da parte di una endopeptidasi, della porzione carbossiterminale (C-terminale) esapeptidica che è responsabile dell'attività biologica del peptide. Tra le metallopeptidasi che contribuiscono all'inattivazione fisiologica della NT troviamo l'endopeptidasi neutrale, 24.11 (EC3.4.24.11), l'enzima di conversione dell'angiotensina, l'endopeptidasi 24.15 (EC3.4.24.15) e l'endopeptidasi 24.16 (EC3.4.24.16; St-Gelais et al., 2006).

### II.1.1 Recettori per la NT

La maggior parte degli effetti biologici della NT derivano dall'interazione tra il peptide ed i diversi sottotipi recettoriali presenti sulla superficie cellulare. Attualmente esistono tre recettori specifici per NT nel SNC: NTR1 e NTR2 che appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G di classe A con un'omologia condivisa del 60%, e NTR3 un membro della famiglia sortilina costituito da un singolo dominio transmembrana situato in vescicole intracellulari di neuroni e glia che sembra coinvolto nell'inattivazione della NT, nella selezione delle cellule e nel trofismo delle cellule tumorali (Navarro et al., 2001; White et al., 2012). Recentemente, accanto a questi recettori ben caratterizzati, è stata proposta la quarta proteina intracellulare relativa ai recettori di selezione dei lieviti identificato come NTR4/ SorLA (Jacobsen et al., 2001), che è espressa solo nei neuroni e probabilmente coinvolta nello sviluppo neurale stimolando la proliferazione e la crescita del neurite (Antonelli et al., 2007). Tutti e quattro i recettori condividono la caratteristica di riconoscere il frammento C-terminale di 8-13 aa e mostrano relazioni strutturali e funzionali simili alla NT (Tyler-McMahon et al., 2000; Fig.II.2).

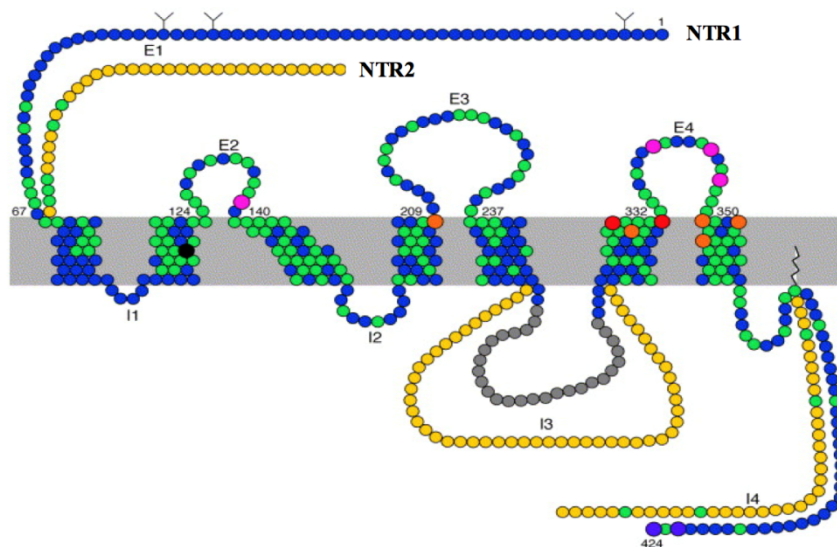


Fig.II.2 Rappresentazione di NTR1.

Tuttavia, la maggior parte degli effetti farmacologici e fisiologici di NT sono mediati attraverso NTR1 che agisce preferenzialmente attraverso la proteina Gq (Dobner, 2005; Zhang et al., 2016; Fig.2). Le prime indicazioni sull'esistenza di sottotipi del recettore NTergico hanno mostrato la

presenza di due differenti classi di siti di legame per NT in tessuti cerebrali o gastrointestinali. I siti ad alta affinità ( $K_d \sim 0.1-0.3$  nM) sono sensibili agli ioni ( $\text{Na}^+$ ) e guanosina trifosfato (GTP), e riducono l'affinità del recettore per NT, mentre i siti a bassa affinità ( $K_d$  3-5 nM) sono meno sensibili agli ioni  $\text{Na}^+$  e insensibili a GTP. La prima identificazione molecolare di un recettore NT è stata ottenuta da Nakanishi e colleghi isolando un singolo clone di acido deossiribonucleico complementare (cDNA) di 3633 nucleotidi. Quest'ultimo è largamente espresso nelle cellule di Mammifero legando selettivamente NT con alta affinità ( $K_d \sim 0.2$  nM) ed è insensibile a levocabastina, un potente anatagonista del recettore istamina H1 in grado di bloccare selettivamente il legame della NT con i siti a bassa affinità senza modificare le proprietà di legame dei siti ad alta affinità. Il NTR1 umano è stato clonato per la prima volta dalle linee cellulari HT29 di adenocarcinoma del colon (Haase et al., 2006) e risulta essere costituito da una proteina di 418 aa che presenta un'omologia di sequenza dell'84% con il NTR1 di ratto. Quest'ultimo, inoltre, è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 20 (20q13) e contiene tre introni situati nella regione codificante. La presenza di un polimorfismo ripetuto di 4 nucleotidi, localizzato 3 kb dal gene del recettore, risulta essere di particolare importanza perché potrebbe costituire un marker per lo studio della relazione tra il gene NTR1 e i disordini psichiatrici (Patel et al., 2016). Negli ultimi anni, test di mutagenesi e di modellazione molecolare condotti sul NTR1 del ratto hanno fornito risultati interessanti sul processo di internalizzazione del recettore e sull'identificazione di siti e residui amminoacidici specifici coinvolti nel legame di NT e del suo antagonista SR48692. Difatti è emerso che il sito di legame dell'antagonista si trova in una tasca delimitata da due residui che appartengono ai domini transmembrana 6 e 7 (TM6 e TM7). All'interno di tali domini l'Arg327 e la Tyr351 sono cruciali per il legame di SR48692. Tuttavia l'Arg327 è coinvolta anche nel legame della NT insieme alla Tyr347 localizzata nel terzo loop extracellulare. Sulla base di tali risultati, studi di modellamento delle proteine hanno consentito di capire che il terzo loop extracellulare che collega TM6 e 7 interagisce con la NT (Pelaprat, 2006). Visto che parte del sito di legame NT sembra stare in cima alla tasca di legame di SR48692 in una regione delimitata dal terzo loop extracellulare e dai domini TM 6 e 7, questo potrebbe spiegare la natura competitiva di SR48692 sulla NT. Dopo l'interazione con la NT, il 60-70% di NTR1 si internalizza mediante un processo dipendente dalla temperatura (Bauco and Rompré, 2003). Le prove biochimiche, infatti, suggeriscono che il recettore non viene riciclato alla membrana plasmatica dopo l'internalizzazione indotta dal ligando. La regione del recettore coinvolta nel processo di internalizzazione è la coda C-terminale e, più particolarmente, i residui Thr422 e Tyr424 situati all'estremità della coda.



Il sottotipo NTR2, è una proteina di 410 aminoacidi che presenta una bassa proprietà di legame per la NT e questo legame può essere inibito da levocabastina (Piatek et al., 2005). Al contrario è stato stabilito che SR48692 (2-[[[1-(7-Chloro-4-quinolinyl)-5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]carbonyl]amino]-tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decane-2-carboxylic acid), avendo una bassa affinità per NTR2 rispetto a NTR1, risulta un antagonista attivo e altamente specifico per diverse attività cellulari (Liu et al., 2017). Nei roditori (ratto e topo) NTR2 è leggermente più lungo (416 aminoacidi) rispetto alla loro controparte umana (410 aminoacidi). A differenza del NTR1, questo recettore presenta una coda extracellulare N-terminale breve e un terzo *loop* intracitoplasmatico più lungo. Sempre dal punto di vista strutturale è stata rilevata l'assenza di siti di N-glicosilazione nel dominio N-terminale e la sostituzione di un residuo di Asp, generalmente conservato in TM2, da una Ala (Ref 16, 17) o da un residuo di Gly18. Anche in questo caso studi di mutagenesi hanno mostrato che tale sostituzione è responsabile della bassa sensibilità del recettore NTR2 a ioni Na<sup>+</sup> mentre la presenza dell'Asp ne ha migliorato tale sensibilità.

Per quanto riguarda NTR3/ sortilina è stato sintetizzato a partire da un precursore processato in un peptide di 5 kDa e una proteina di membrana di 95 kDa. Il gene che codifica per la sortilina umana, noto come SOR1, è stato mappato nella parte prossimale del braccio corto del cromosoma 1 (Fig.II.3).

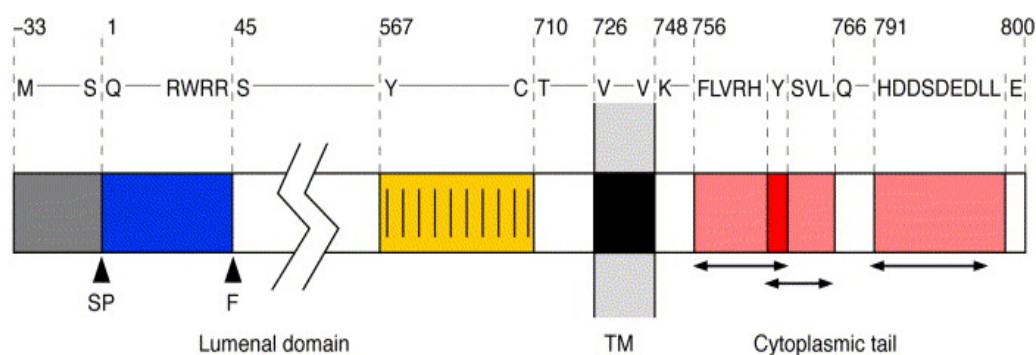


Fig.II.3 Rappresentazione del nts3/gp95/sortilina umana.

I due trascritti della sortilina sono approssimativamente di 8 kb e 3.5 kb espressi nei tessuti umani. NTR3 ha una duplice funzione: da una parte funge da modulatore di segnalazione NTergica quando è co-espresso con un altro recettore di NT, dall'altra agisce singolarmente come recettore funzionale coinvolto nella migrazione. NTR3 non è specifico per la NT ma è in grado di legare altri ligandi come la lipasi lipoproteina, i proneurotrofine, la proteina RAP (proteina associata ai

recettori) o la proteina SAP (proteina attivatore sphingolipida; Mazzella, 2001; Lefrancois et al., 2003). Esso può agire come un co-recettore per partecipare alla vera segnalazione NT/NTR1. Difatti, studi di immunoprecipitazione su linee cellulari di adenocarcinoma HT29, hanno dimostrato che il NTR3 forma eterodimeri con il NTR1. Inoltre, su stimolo della NT, il complesso NTR1/NTR3 è internalizzato e l'interazione tra i due recettori modula sia la fosforilazione di protein chinasi attivata da mitogeno (MAPK) indotta da NT sia il turnover di fosfoinositide (PI) mediata da NTR1 (Martin et al., 2002). Nelle cellule microgliali umane C13NJ, NTR3 è l'unico recettore endogeno di NT noto in grado di provocare la migrazione cellulare (Dicou, 2008).

### II.1.2 Meccanismo d'azione dei recettori NTergici

Il legame della NT con gli specifici recettori innesca diversi meccanismi cellulari. La stimolazione di NTR1 per il suo ligando (NT) scatena l'azione della fosfolipasi C (PLC) tramite il suo accoppiamento alla prima subunità  $G_{\alpha q/11}$  (Najimi et al., 2002). L'attivazione del PLC porta alla produzione di inositolo-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e di diacilglicerolo (DAG) da parte del fosfatidilinositolo-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>), un fosfolipide presente nello strato interno della membrana plasmatica. Questi due secondi messaggeri, a loro volta, inducono l'attivazione del PKC e la mobilitazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare, che sono fattori chiave oncogeni. Parallelamente, diversi *pathway* di segnalazione potenzialmente coinvolti nella proliferazione cellulare, nella sopravvivenza, nella migrazione e nell'invasione vengono descritti dopo la stimolazione di NTR1. I meccanismi che mediano gli effetti del sistema NTergico coinvolgono *pathway* multipli e cellula-dipendenti e quello più comunemente studiato è il pathway PKC/ERK indotto da NT. Difatti, la PKC stimolata da NTS/NTR1 induce una MAPK mediante stimolazione diretta di Raf-1, indipendentemente da Ras, oppure mediante trans-attivazione del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR; Guha et al., 2003). Entrambi gli effetti possono essere impediti da SR48692 o dall'antagonista ad ampio spettro SR142948A65 che riconosce sia NTS1 che NTS2. L'attivazione di MAPK tramite NTR1 è principalmente associata a una crescita cellulare incontrollata, che può aggravare la crescita dei tumori (Harikumar et al., 2010; Kisfalvi et al., 2010) come è stato osservato nella linea cellulare HT29 del carcinoma umano del colon.

Un'altra possibile via di segnalazione potrebbe avvenire attraverso l'attivazione della guanosina ciclica monofosfato, dell'adenosina ciclica monofosfato, la produzione dell'acido arachidonico (St-Gelais et al., 2006) e l'inibizione dell'attività della proteina chinasi B (Liu et al., 2004).

Studi condotti su topi KO per NTR1 hanno rilevato il coinvolgimento del recettore nell'ipotermia, nei disturbi del movimento, nell'analgia e nella motilità gastrointestinale. NTR1 dimostra, inoltre, una stretta associazione con il sistema DAergico e glutammatergico (Bose et al., 2015). L'attivazione di tale recettore promuove e rafforza la segnalazione endogena del glutammato nelle regioni del cervello aumentando l'attivazione del PKC e portando alla fosforilazione del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA). Contestualmente, numerosi studi hanno suggerito che NTR1 attraverso la possibile modulazione del recettore DAergico gioca un ruolo importante nella disregolazione della funzione striatale DAergica che si ritiene secondaria ad una carenza di glutammato nella schizofrenia. Difatti, risultati ottenuti su topi privi di NTR1 hanno mostrato bassi livelli di glutammato e di NMDA nella loro corteccia prefrontale mediale (mPFC) rispetto ai topi *wilde type* (Li et al. 2010). Il recettore NTR1, inoltre, è altamente espresso nei neuroni dopaminergici nigro-striatali, che si degenerano nella malattia del PD. Questi dati sono coerenti con l'ipotesi che NTR1 sia coinvolto il controllo delle condizioni patofisiologiche delle malattie neurodegenerative (Boules et al., 2013). Le proprietà farmacologiche e di segnalazione di NTR2 sono ancora controverse. In particolare, non è chiaro se NT agisce come un agonista, un agonista inverso o da antagonista. Il risultato di diversi studi ha confermato l'azione agonistica del SR48692 (Richard et al., 2001; Sarret et al., 2002) il quale fu originariamente descritto come un antagonista con una maggiore affinità per NTR1 rispetto a NTR2. All'interno di linee cellulari esprimenti NTR2 umano, infatti, SR48692 stimola la mobilitazione del  $Ca^{2+}$  o la formazione dell'IP, nel momento in cui sia la NT che levocabastina antagonizzano tale risposta. Le proprietà farmacologiche specie-dipendenti di NTR2 potrebbero essere associate a variazioni nell'attività costitutiva del recettore appartenente alla famiglia della grelina (Richard et al., 2001; Holst et al., 2004). Ulteriori risultati indicano un'elevata capacità di NTR2 di internalizzazione, processo indotto dal ligando, nei complessi recettore-ligando (Sarret et al., 2002). Tuttavia, l'internalizzazione di questo recettore è apparentemente associata all'attivazione delle ERK regolate dal segnale ma non alla mobilitazione del  $Ca^{2+}$  (Gendron et al., 2004). Per quanto riguarda NTR3/sortilina, questo complesso è in grado di interagire sia con la NT che con una vasta varietà di ligandi come la proteina associata al recettore (RAP) e la lipasi lipoproteina (LpL; St-Gelais et al., 2006). È possibile che NTR3/sortilina comportandosi come un vero e proprio recettore nei mammiferi sembra essere attivo nelle funzioni cerebrali non soltanto correlate alla NT. Difatti, numerose evidenze hanno mostrato il suo coinvolgimento nella migrazione di cellule microgliali umane mediante stimolazione del *pathway* della MAP e della fosfatidilinositolo 3-

chinasi, nella proliferazione di linee cellulari tumorali (Dal Farra et al., 2001), nella modulazione del *signalling* della NT mediante la regolazione del processo di assorbimento e nella degradazione del neuropeptide (Navarro et al., 2001; Morinville et al., 2004).

### II.1.3 Localizzazione della NT e dei relativi recettori nel SNC

Le indicazioni relative alla distribuzione del NT e dei suoi rispettivi recettori sono stati identificate maggiormente per il ratto anche se altre specie di vertebrati presentano *pattern* simili. Nel cervello di tale roditore è stata rilevata la presenza di diversi circuiti neuronali contenenti la NT in cui un primo circuito comprende le cellule nel nucleo centrale dell'AMY e si estende fino al nucleo VMN dell'HTH. Altri circuiti invece coinvolgono diverse regioni cerebrali quali l'HIP, la corteccia cingolata e frontale, la VTA, la PFC e prepiriforme, diversi nuclei come l'*accumbens*, l'endopiriforme, l'olfattorio anteriore, il DMH, il *raphe magnus*, il nucleo della stria terminale e il nucleo parabrachiale (Zahm et al., 2001; Fig.II.4).

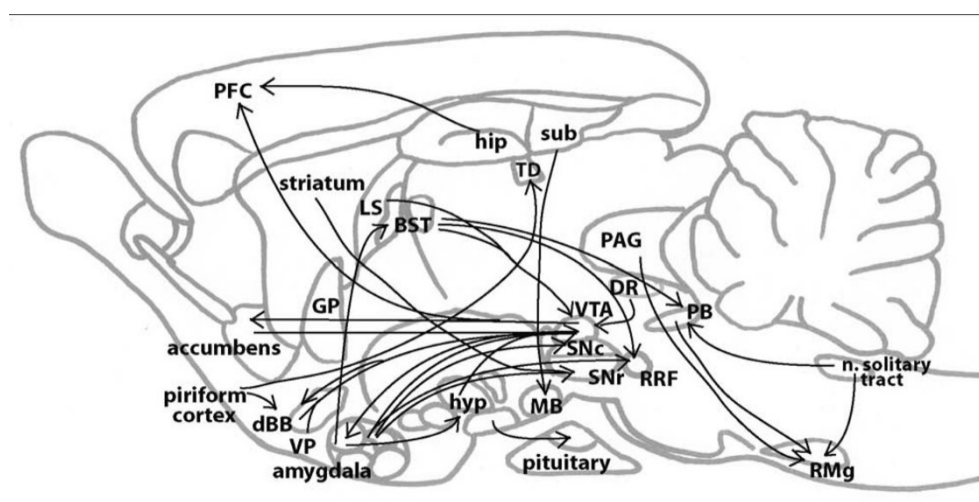


Fig.II.4 Rappresentazione sagittale del *pathway* NTergico nel cervello di roditori.

Dal punto di vista recettoriale, analisi di *Northern-blot* hanno rivelato che gli mRNA NTR1 sono espressi rispettivamente nel cervello e nell'intestino di ratto e uomo. Nel cervello, gli esperimenti di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che nei neuroni della banda diagonale di Broca, del setto nucleare mediale, del nucleo *basalis magnocellularis*, del nucleo soprachiasmatico, dell'area sopramammillare, della substantia nigra e della zona ventrale tegmentale erano presenti elevati livelli di mRNA NTR1 così come i neuroni del ganglio radiale dorsale del midollo spinale.

Una significativa espressione di tale recettore è stato osservato anche nella substantia nigra, mentre tale segnale è assente nello striato. Al contrario, studi di autoradiografia e immunoistochimica hanno mostrato la presenza della proteina NTR1 in entrambe le regioni del cervello. Questi risultati supportano l'ipotesi che i neuroni della DA nella substantia nigra sintetizzano NTR1, che si trova nel loro soma e nei dendriti e anche nei terminali dello striato successivo al trasporto assonale.

Per quanto riguarda il NTR2, dati di ibridazione *in situ* hanno evidenziato la sua presenza principalmente nel sistema olfattivo, nei cortici cerebrali e cerebellari, nell'HIP e nei nuclei HTH del topo e del ratto. Questa distribuzione è diversa da quella di NTR1 e solo alcune aree del cervello (ad esempio la banda diagonale di Broca, il nucleo settale mediale e il nucleo soprachiasmatico) sono arricchiti di entrambi i recettori. Numerosi studi ontogenici hanno dimostrato che mentre l'mRNA NTR2 di topo è rilevabile solo dal 14° giorno postnatale e non raggiunge concentrazioni in età adulta prima del 30° giorno, l'mRNA di NTR1 è già espresso alla nascita, con picchi elevati tra i primi 7 e 10 giorni di vita che tendono a diminuire progressivamente per raggiungere i livelli adulti tra i 30 e i 40 giorni. A livello cellulare, l'mRNA NTR2 di ratto è espresso nei neuroni, nella glia e nelle cellule ependimali, mentre nel topo è prevalentemente concentrato sui neuroni.

Per quanto riguarda NTR3/sortilina è largamente espresso nei sistemi sensoriali e nell'apparato motorio corticale come la corteccia frontale e il nucleo subtalamico (Sarret et al., 2003; Geisler et al., 2006). Tale sottotipo è localizzato anche nella glia, nei neuroni e negli adipociti ed è noto per riconoscere la NT dal suo sito di legame extracellulare soltanto dopo la traslocazione nella membrana plasmatica (Binder et al., 2001). Contestualmente il NTR4 è localizzato per il 90% a livello intracellulare e per il 10% sulla superficie cellulare. Nel cervello è particolarmente distribuito nel giro cingolato, nella corteccia entorinale, nelle regioni CA1, CA2 e CA3 dell'HIP, nel nucleo oculomotorio e nello strato delle cellule del Purkinje del cervelletto (Geisler et al., 2006).

#### **II.1.4 Effetti del sistema NTergico sui disordini metabolici**

Il sistema NTergico, come ormai noto e accettato dal mondo scientifico, svolge un ruolo primario nella regolazione di diversi processi neurofisiologici come l'alimentazione, l'ipotermia, l'infiammazione, i disturbi psichiatrici e alcune forme tumorali. Alterazioni dei meccanismi cellulari mediati dalla NT possono indurre gravi patologie come il diabete e l'obesità in quanto tale neuropeptide è ampiamente presente a livello ipotalamico che è una delle sedi principalmente implicata nel mantenimento dell'omeostasi energetica e del *feeding*. Difatti la sua

somministrazione nella VTA o nella parte ventromediale dell'HTH porta ad una diminuzione dell'assunzione di cibo (Opland et al., 2013). Questo dato è stato supportato da cambiamenti di espressione della NT negli animali con disturbi alimentari ed in modo particolare su topi iperfagici e obesi i quali hanno mostrato una riduzione dell'espressione della NT nei vari nuclei dell'HTH. Similmente, mentre la carenza del suo recettore NTR1 ha causato moderati aumenti nell'assunzione di cibo e nel peso corporeo e anoressia indotta da NT nei topi, la somministrazione acuta di PD149163, un agonista selettivo di NTR1 (Petrie et al, 2004), ha indotto l'azione anoressigenica della NT, suggerendo il coinvolgimento del recettore nell'alimentazione e nella regolazione del peso corporeo (Kim et al., 2010). Parallelamente, NTR1 è in grado di regolare l'equilibrio energetico mediando l'effetto anoressico non solo della NT ma anche di altri fattori anoressigenici come la leptina. La somministrazione di tale ormone aumenta l'espressione ipotalamica di NT nei ratti sani e nelle linee cellulari ipotalamiche *in vitro* (Belsham et al., 2004; Brown et al., 2017). È interessante rilevare che l'antagonista SR48692 sembra invertire l'azione della leptina sulla sazietà (Sahu et al., 2001). Difatti, la somministrazione di anticorpi anti-NT o antagonisti del recettore NT ha bloccato completamente l'azione anoressica di leptina nei ratti ciò suggerisce che la NT, rilasciata forse da neuroni dell'HTH, è un mediatore essenziale dell'effetto inibitorio della leptina sull'alimentazione. Poiché i neuroni NT ipotalamici sono noti per esprimere il recettore di leptina, è possibile che quest'ultima eserciti un'azione diretta per stimolare il rilascio di NT. Infatti l'espressione del neuropeptide è down-regolata in modelli animali mancanti di leptina (Kim et al., 2008). Il sistema leptina/NTR1 può, quindi avere un impatto notevole nella regolazione non omeostatica del comportamento alimentare e mentre i topi privi del recettore mostrano una normale assunzione di cibo, quelli che, invece, assumono una HFD ed una *high sucrose diet* (HSD) sviluppano obesità. La regione LHA è il sito in cui la leptina e la NT esplicano la loro azione coordinata. È stato osservato, infatti, che circa il 30 % dei neuroni NT si co-esprimono con il LepRb maggiormente nel LHA, ove costituiscono gli unici neuroni nel cervello direttamente attivati dalla leptina. Questi risultati sono promettenti per il possibile utilizzo di NT-ligandi come potenziali farmaci terapeutici nella cura dei disturbi alimentari.

### II.1.5 NT e infiammazione

È interessante osservare che fra le diverse azioni neurofisiologiche regolate da NT vi è il suo coinvolgimento nell'infiammazione come evidenziato dalla NT periferica in grado di generare sintomi infiammatori come la vasodilatazione, aumenta la permeabilità vascolare, la degranolazione delle cellule mastiche e la valorizzazione della migrazione direzionale e della fagocitosi dei neutrofili (Ye et al., 2016). È stato riportato che tale neuropeptide è, inoltre, implicato nella produzione di citochine pro e anti-infiammatorie come IL-1 e l'interleuchina-8 (IL-8) rispettivamente in macrofagi alveolari attivati e in cellule umane di colonociti (Law et al., 2012). Anche se la NT è generalmente nota come fattore pro-infiammatorio, un effetto opposto è stato recentemente descritto in un processo infiammatorio cronico indotto dal solfato di sodio di destrano nel topo. In questo modello, l'attivazione di NTR1 ha dimostrato di stimolare la guarigione delle ferite intestinali attraverso un *pathway* dipendente dalla cicloossigenasi (COX)-2. Allo stesso modo, uno studio condotto sui macrofagi, in condizioni infiammatorie e iperglicemiche, ha sottolineato come diversi neuropeptidi e in particolar modo la NT hanno ridotto la risposta infiammatoria di tali cellule immunitarie stimolando la loro capacità di migrazione. Questi risultati evidenziano il potenziale ruolo terapeutico di NT in condizioni compromesse come le ulcere del piede diabetico, caratterizzate da uno stato proinfiammatorio patologico e da una ridotta migrazione cellulare (Moura et al., 2013). Contrariamente, in adipociti dei tessuti grassi epididimali di topi NT -/- è stata mostrata una riduzione delle dimensioni e del numero di infiltrati infiammatori e di macrofagi, indicando come la carenza di NT protegge da numerose comorbidity (vale a dire aumentata resistenza all'insulina e steatosi epatica) associata ad un'elevata assunzione di grassi alimentari (Li et al., 2016).

Negli ultimi anni è stato evidenziato, anche, il coinvolgimento di NT nelle risposte immunitarie del SNC attraverso l'azione di un lipopolisaccaride che ha indotto l'espressione di mRNA NT nei neuroni contenenti l'ormone che rilascia il CHR del PVN dell'HTH (Loum-Ribot et al., 2006). Sulla base di questo lavoro, è stato ipotizzato che la NT possa essere rilasciata nella circolazione *portale* ipofisaria per scatenare reazioni legate all'ipofisi associata alla mobilitazione del sistema immunitario. Similmente la NT da sola o in condizioni infiammatorie è in grado di ridurre l'attivazione dei *pathway* di segnalazione NF- $\kappa$ B e di c-Jun N-terminal kinases (JNK) entrambi coinvolti in diverse risposte immunitarie mediate dalle cellule, aumentando la trascrizione genica di chemochine, citochine, molecole di adesione, enzimi che producono mediatori

infiammatori secondari e inibitori dell'apoptosi (Xue et al., 2017). Tuttavia, anche IL-10 è stata ridotta dalla NT, suggerendo che tale neuropeptide non solo è capace di down-regolare fattori infiammatori, ma anche quelli anti-infiammatori, riducendo la capacità immunologica delle cellule dendritiche (da Silva et al., 2011). Nonostante le poche evidenze sul ruolo della NT nell'infiammazione del SNC, è stato confermato anche il suo possibile ruolo proinfiammatorio sulle cellule di microglia che potrebbe contribuire all'infiammazione del cervello in malattie degenerative come il PD e l'AD.

### **II.1.6 NT e disturbi comportamentali**

Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che i neuropeptidi giocano un ruolo importante nella modulazione dell'ansia e nella patofisiologia dei disturbi psichici. Tra questi vi è la NT la quale all'interno del SNC, è coinvolta nello stress, nella modulazione del dolore, nei processi di ricompensa, della tossicodipendenza e della depressione (Kinkead and Nemeroff, 2004; László et al., 2009). In tale contesto è stato osservato che la disfunzione combinata dei neuroni NT e del sistema mesocorticale-mesolimbico della DA potrebbe svolgere un ruolo importante nello sviluppo del PD (Hernandez-Chan et al., 2015) e della schizofrenia (Piccart et al., 2015). Questo può essere ulteriormente confermato dal fatto che le associazioni anatomiche e funzionali della NT con il sistema DA sono coinvolte in alcuni disturbi clinici come appunto la schizofrenia e le droghe di abuso. È stato rilevato che gli schizofrenici oltre ad avere una ridotta espressione (40%) dei NTRs nella corteccia entorhinal (Borroto-Escuela et al., 2016; Feifel et al., 2016) mostrano diminuite concentrazioni della NT nel loro fluido spinale cerebrale che inducono livelli significativamente più elevati della psicopatologia da pretrattamento, mentre la somministrazione centrale di NT ne causa effetti antipsicotici. Al contrario nella PD alte concentrazioni plasmatiche di NT sono presenti sia nella zona compacta che in zona reticolata del SN rispetto ai CTRL (Schimpff et al., 2001). Altri studi evidenziano come a livello cerebrale i cervelli dei pazienti con PD hanno meno neuroni dopaminergici e un'espressione molto bassa di NTR1 (Dias et al., 2013). Similmente, topi con PD trattati con 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) erano caratterizzati da livelli significativamente più bassi di NT e di mazindolo legati allo striato e al SN, indicando una grave riduzione dei NTRs nei siti di assunzione di DA nei processi di degradazione che causano il PD (Ferraro et al., 2014). La NT è, inoltre, coinvolta nel meccanismo d'azione degli psicostimolanti, agonisti del recettore della DA, i quali aumentano la sua trasmissione a livello



neuronale (Boules et al., 2016). L'azione di sostanze come la cocaina, l'anfetamina e i loro derivati è mediata dal sistema mesotelencefalico della DA e dai circuiti neuronali ad esso correlato. Nei modelli animali è stato osservato che la somministrazione di tale neuropeptide determina un aumento della risposta alle droghe. Questo fenomeno di sensibilizzazione comportamentale risulta essere associato a cambiamenti del *pattern* di connettività sinaptica, della biochimica cerebrale legati allo sviluppo della dipendenza soprattutto a livello della VTA coinvolgendo neurotrasmettitori come la DA e il glutammato (Bose et al., 2015; Woodworth et al., 2017). Tale area encefalica riceve numerose innervazioni dalla NT ed esprime elevati livelli dei relativi recettori. È stato osservato che la microiniezione (mediante applicazione stereotassica) della NT nella VTA ha effetti acuti e a lungo termine in maniera simile a quelli prodotti dalla somministrazione sistemica degli psicostimolanti. La NT nel VTA incrementa la *locomotor activity* nei ratti e aumenta i livelli extracellulari di DA nel nucleo *accumbens* e nella PFC (Woodworth et al., 2017). Se la somministrazione i.c.v. risulta essere ripetuta nel tempo i ratti vengono sensibilizzati agli effetti stimolanti dell'anfetamina e della cocaina suggerendo, ulteriormente, che la NT e gli psicostimolanti potrebbero agire sui sistemi che innescano la sensibilizzazione comportamentale. L'iniezione della NT nel VTA è, inoltre, responsabile degli effetti di ricompensa che vengono mostrati sia nel CPP, test mnemonico atto a valutare la preferenza di un animale per un luogo precedentemente associato ad un evento di ricompensa sia a seguito di una stimolazione elettrica cerebrale (Geisler et al., 2006). Complessivamente, questi dati affermano che la NT è coinvolta nell'attivazione motoria e negli effetti di ricompensa operata dagli psicostimolanti (Felszeghy et al., 2007). Oltre al VTA, un'altra area cerebrale in cui si riscontrano elevati livelli di NT e recettori ad essa associati è l'AMY, soprattutto i nuclei centrali e intercalati. L'AMY, area del sistema limbico, è responsabile del controllo neurale dell'emozione, della memoria, del rinforzo e nei processi di ricompensa/motivazione (Gaffrey et al., 2017). In particolar modo, uno studio condotto a livello di quest'area ha mostrato come la somministrazione, in due differenti dosi, di antagonisti del recettore NTR1 ha significativamente inibito gli effetti comportamentali ansiolitici e di ricompensa della NT a seguito di test di ricompensa e ansiometrici specifici come il CPP e dell'EPM (Laszlo et al., 2006). Considerata l'azione neuromodulatrice di tale neuropeptide, la diretta somministrazione della stessa NT e dei suoi agonisti (PD149163) blocca anche gli effetti comportamentali dell'agonista della serotonina-2 (5-HT<sub>2</sub>) suggerendo il suo coinvolgimento sulla trasmissione serotonergica ai recettori 5-HT<sub>2</sub> (Feifel et al., 2003). L'importanza dei meccanismi serotonergici è data dal fatto che essi sono fortemente implicati nell'ansia e nella depressione e

l'inibizione di tali recettori potrebbe fungere da meccanismo che porta ansiolisi ed effetti antidepressivi (Weisstaub et al., 2006). Al fine di dimostrare il coinvolgimento della NT nei disordini dell'umore e dell'ansia, sono stati effettuati numerosi studi in cui è stato osservato come bassi livelli di NT in pazienti ansiosi, non solo riducevano la paura prodotta da lesioni serotoninergiche del raphe dorsale (Shugalev et al., 2005) ma anche la durata del *freezing* in seguito all'azione della beta lactotensina, un ligando naturale dei recettori della NT a livello del pallido ventrale (Yamauchi et al., 2007). È ormai noto, infatti, che questa area è strettamente collegata ad aree cerebrali implicate nella regolazione dello stato ansioso come il pallido ventrale (Chang and Grace, 2014; Ollmann et al., 2015). Difatti, la proteina somministrata mediante una microiniezione all'interno di tale area, di circa 100 ng e 250 ng, ha indotto un effetto ansiolitico associato ad un'alterazione del recettore NTR1, inibito da un suo antagonista, evidenziando anche in questo contesto il coinvolgimento del sistema DAergico. Uno studio condotto negli ultimi mesi ha mostrato come a seguito di uno stress cronico che induce ansia (CUS) la modulazione neuropeptinergica della trasmissione sinaptica si sarebbe alterata nel nucleo della stria terminale, area encefalica ampiamente coinvolta in tali disordini comportamentali. In particolare il blocco farmacologico dei recettori della NT distribuiti in tale sede cerebrale ha abolito la ridotta esplorazione nei bracci aperti nell'EPM e l'immobilizzazione nel test del nuoto forzato indotte dal CUS, confermando il coinvolgimento di tale neuropeptide nei disturbi dell'ansia (Laszlo et al., 2010; Normandeau et al., 2017).

### **II.1.7 NT e disturbi cognitivi**

Data la localizzazione della NT in diverse regioni del SNC, numerosi studi dimostrano il coinvolgimento di tale neuromodulatore nell'apprendimento, nella memoria e la correlazione con una forma precoce del morbo dell'AD (Xiao et al., 2014). La presenza del neuropeptide e dei relativi recettori in aree cerebrali come l'HIP e la corteccia (COR) ha suggerito un ruolo funzionale di questa proteina nelle strutture limbiche avanzando l'ipotesi che la NT è in grado di modulare tali processi cognitivi. Uno studio condotto negli ultimi anni, ha dimostrato la presenza di un'alterata performance della WM associata ad un polimorfismo di NTR1 nell'uomo (Li et al., 2013) e di siti di legame variati della NT in funzione dell'età e dello stato cognitivo (Rowe et al., 2006). Per WM si intende la capacità del cervello in grado di ragionare, comprendere e apprendere (Li et al., 2013) ed è coinvolta nell'integrazione e nella manipolazione dell'informazione. È noto che il sistema

DAergico svolge un ruolo centrale nel processo di WM (McNab et al., 2009) e studi farmacologici sugli animali e sull'uomo hanno indicato che tale sistema riesce a modularla dal momento che una sua alterazione risulta essere accompagnata dall'accumulo del peptide beta amiloide (A $\beta$ ) a livello dell'HIP (Leighty et al., 2004). Studi elettrofisiologici effettuati su roditori hanno, inoltre, rilevato che la performance della WM è correlata ai processi di depressione a lungo-termine (Nakao et al., 2002). Gli effetti della NT sulla memoria sono solitamente mediati dal legame con il recettore NTR1 ma è stato visto una riduzione della memoria correlata ad un evento pericoloso in topi KO per NTR2 (Yamauchi et al. 2007). La NT, agendo sul NTR1, riduce la funzione fisiologica del recettore DA (Jomphe et al., 2006) e modula una serie di comportamenti mediati da tale neurotrasmettitore. La somministrazione di un antagonista di NTR1, inoltre, altera la WM in una *task* di apprendimento (Tirado-Santiago et al., 2006). Il potenziale collegamento, quindi, tra l'HIP, il gene NTR1 e la WM è supportato non soltanto dall'elevata distribuzione della NT e dei suoi recettori a livello HIP, ma anche dall'aumentata espressione del mRNA di NTR1, della proteina e dall'effetto della NT sull'attivazione degli interneuroni CA1 che proiettano verso tale area encefalica (Li et al., 2013). Similmente anche studi precedenti hanno suggerito come la perdita di NTR1 nel nucleo basale magnocellulare è responsabile di una ridotta WM nei ratti che eseguono un T-maze alternato. Difatti, l'attivazione di NTR1 migliora l'apprendimento spaziale e la memoria mediante la down-regolazione dei canali del potassio tandem TREK-2 PKC-dipendenti, suggerendo che la facilitazione e l'eccitabilità neuronale indotta da NT rappresenta un nuovo substrato cellulare e molecolare per la corretta funzionalità cognitiva (Xiao et al., 2014). Contestualmente, numerosi studi hanno valutato l'efficacia cognitiva degli agonisti di NTR1. In particolare, sia NT69L (Briody et al., 2010) che PD149163 hanno attenuato deficit cognitivi indotti da psicotomimetici in pazienti schizofrenici nonché hanno migliorato le prestazioni mnemoniche, compromesse a seguito della somministrazione di scopolamina, nel NOR (Hillhouse and Prus, 2013).

Recentemente è stato suggerito che la disfunzione dei sistemi grelina/NT potrebbe essere coinvolta nello sviluppo dell'obesità e della sindrome metabolica (Gahete et al., 2010) associate all'infiammazione (Bossard et al., 2007; Koon et al., 2009) e a deficit cognitivi come la memoria e l'apprendimento (Ohinata et al., 2007). In tale contesto AD, una patologia caratterizzata da un severo deficit cognitivo può essere aggravata da condizioni di obesità, di sindrome metabolica, di alterazione dello stato energetico e dall'infiammazione (Giordano et al., 2007; Jan et al., 2017). Per questo motivo risulta plausibile che la modulazione dei sistemi grelina/NT possa influenzare in

maniera rilevante tale patologia (Giordano et al., 2007). In particolare, valutazioni di espressione dell'asse grelina/NT hanno proposto una riduzione determinante dei livelli di mRNA della grelina, di una sua variante, la In2-grelina, di un enzima responsabile dell'acilazione della grelina ovvero la grelina-O-aciltrasferasi e del recettore che secerne l'ormone della crescita di tipo 1a all'interno di regioni della corteccia (circonvoluzione temporale) particolarmente colpite dall'AD, mentre risultava essere aumentata l'espressione del recettore che secerne l'ormone della crescita di tipo 1b. In aggiunta i livelli di NTR1 e NTR2 risultavano profondamente diminuiti nell'AD così come anche i livelli di mRNA della NT (Gaete et al., 2010). Complessivamente, tali risultati mostrano una stima quantitativa dei sistemi grelina/NT, alterati marcatamente nei pazienti malati, suggerendo come tale *cross-talking* potrebbe contribuire ai deficit cognitivi che caratterizzano tale patologia.

# CAPITOLO III

## MATERIALI E METODI

### III.1 Modello sperimentale

Nel campo della Neurobiologia, la scelta di un modello sperimentale per trattamenti farmacologici *in vitro* o *in vivo* risulta essere di particolare importanza, nonostante tale predilezione rimane fortemente condizionata oltre che da fattori di tipo scientifico anche da fattori di tipo economico-organizzativo. L'utilizzo di un sistema *in vitro* che ci permette di studiare diversi aspetti cellulari in modo indipendente dal contesto ambientale (organismo, tessuto o organo), all'interno del quale le cellule operano in condizioni fisio-patologiche, è sicuramente vantaggioso in quanto semplifica i problemi, ma può dare luogo anche ad un'approssimazione molto spesso grossolana della realtà poiché non sempre si è in grado di riprodurre ciò che si intende studiare. Spesso, infatti, l'isolamento di popolazioni cellulari al di fuori del sistema biologico in esame, spesso non consente il raggiungimento di risultati attesi. Difatti, è impossibile studiare i meccanismi alla base di sensazioni quali l'appetito e la sazietà, il dolore o di situazioni psicologiche quali la depressione e l'ansia, senza usufruire di modelli *in vivo* che riproducano questi stati fisiologici o patologici. L'utilizzo di modelli animali più vicini alle condizioni umane permette, inoltre, allo sperimentatore di valutare l'effetto di sostanze naturali o farmacologiche in maniera molto più completa e significativa rispetto a quanto consentirebbe un ipotetico modello cellulare portando così a sviluppare innovative strategie terapeutiche.

Sulla base di tale premesse, è stato preferito il criceto dorato siriano (*Mesocricetus auratus*), un'ibernante facoltativo che in relazione al suo breve periodo di gestazione, alla capacità di ovulare spontaneamente, alle dimensioni corporee, ai bassi costi di vendita e al rapido adattamento alle condizioni di laboratorio rappresenta per la ricerca un ottimo organismo modello.

#### III.1.1 Criceto Dorato (*Mesocricetus auratus*)

Per questo lavoro di tesi è stato utilizzato il criceto Siriano dorato (*Mesocricetus auratus*) appartenente all'ordine dei Roditori (Tabella III.1), e ampiamente utilizzato negli studi sperimentali al pari di topo e ratto grazie ad alcune sue peculiarità: scarsa suscettibilità alle malattie spontanee, rapido sviluppo con ciclo vitale breve e capacità di entrare in ibernazione quando esposto a determinate condizioni. Il ciclo d'ibernazione rappresenta una condizione stato-specifica particolare per tale animale in quanto nel corso di alcune sue fasi, in particolare durante la

transizione torpore/risveglio, avvengono eventi simil-ischemici che costituiscono un ottimo modello naturale per gli studi neurodegenerativi (Canonaco et al., 2005).

REGNO	<i>Animalia</i>
PHYLUM	<i>Chordata</i>
SUBPHYLUM	<i>Vertebrata</i>
CLASSE	<i>Mammalia</i>
SOTTOCLASSE	<i>Teri</i>
SUPERCLASSE	<i>Muroidei</i>
ORDINE	<i>Roditori</i>
FAMIGLIA	<i>Cricetidi</i>
GENERE	<i>Mesocricetus</i>
SPECIE	<i>Mesocricetus auratus</i>

Tabella III.1 Classificazione sistematica di *Mesocricetus auratus*.

Tale roditore è diffuso in tutto il mondo come animale da compagnia e di ricerca ed è un roditore che origina da regioni desertiche dell'Asia minore, dove le estati sono calde durante il giorno (35-38°C) e più fresche nelle ore notturne (6-15°C), mentre gli inverni sono freddi (~10°C) e umidi. Le popolazioni selvatiche sono limitate a una piccola area del Medio Oriente, mentre la maggior parte della specie è distribuita in Siria; alcuni criceti dorati sono stati ritrovati anche in aree della Turchia orientale (Gattermann et al., 2001; Burnie e Wilson, 2005). *Mesocricetus auratus* è un roditore di media dimensione, la femmina è leggermente più grande del maschio e il suo peso può variare tra i 150 e i 190 gr rispetto ai 120-170 gr del maschio. È notevolmente più piccolo del criceto comune (*Cricetus cricetus*) dell'Europa orientale e dell'Asia occidentale, ma più grande rispetto al criceto Roborovski del deserto (*Phodopus roborovskii*), della Cina e della Mongolia. Da un punto di vista fenotipico, il criceto dorato ha un rostro appuntito, occhi relativamente piccoli, orecchie grandi e una breve coda di 1,5 cm. La pelliccia è folla e di colore bruno-dorato nella parte superiore, che sfuma nel grigio o bianco della superficie ventrale, anche la testa ha il tipico colore dorato, caratteristica che gli conferisce la denominazione “dorato” (Fig.III.1).



Fig.III.1 Criceto Dorato - *Mesocricetus auratus*.

Raramente si possono trovare criceti di tale specie con una macchia scura in fronte e una striscia nera su ciascun lato della faccia che si estende dalla guancia al collo (Burnie and Wilson, 2005). Possiede due ampie tasche guanciali, estroflessioni delle guance, che gli permettono di trasportare il cibo trovato, per poterlo accumulare nella tana. La superficie inferiore delle zampe è priva di pelo e presenta dei cuscinetti molto evidenti. Come tutti i roditori, il criceto dorato possiede denti incisivi a crescita continua, che mantiene di lunghezza costante mediante limatura; questi denti foggianti a scalpello tagliente gli permettono di tritare il cibo, ma vengono utilizzati anche come arma di difesa. I criceti dorati hanno su ciascun fianco una ghiandola, molto più sviluppata ed evidente nel maschio, che appare come una macchia scura della pelle ricoperta di pelo e il suo secreto è utilizzato per marcare il territorio. A volte il pelo sopra la ghiandola appare umido e imbrattato, in particolare quando il criceto è eccitato per la presenza di una femmina pronta ad accoppiarsi. Tra i sensi presentano udito e olfatto, tatto molto fine esercitato dalle vibrisse della regione delle labbra e un senso della vista molto evoluto, che permette loro di percepire i colori.

### III.1.2 Biologia

I criceti dorati sono molto prolifici e in grado di riprodursi tutto l'anno; raggiungono la maturità sessuale a 32-42 giorni, anche se non è opportuno far riprodurre le femmine prima dei 2-3 mesi di età. Le femmine indicano la loro disponibilità ai maschi attraverso il rilascio di feromoni nelle secrezioni vaginali, infatti, quando la femmina è pronta ad accoppiarsi aumenta la frequenza di marcatura vaginale, un comportamento caratteristico che si verifica premendo la regione vaginale contro una superficie e spostandola in avanti di qualche centimetro. L'ovulazione nelle femmine



mature di criceti dorati è indotta da fotoperiodi lunghi (luce >12,5 ore) e continua indefinitamente fintanto che il fotoperiodo rimane lungo. Se il fotoperiodo è ridotto, oppure se le femmine sono esposte al buio completo in un ambiente di laboratorio, smetteranno di ovulare. Tuttavia, una volta ambientate a questo breve fotoperiodo, dopo circa cinque mesi, le femmine iniziano l'ovulazione spontanea. In natura, questo ciclo fotoperiodico assicura che la nascita avvenga durante la primavera o l'estate, quando le risorse di cibo sono molte e le richieste energetiche per i processi omeostatici quali la termoregolazione sono basse, aumentando il numero di calorie disponibili per supportare l'allattamento dei piccoli (Huck and Lisk, 1985). Poiché la femmina è molto aggressiva e territoriale, aggredisce facilmente il maschio e può arrivare anche a ucciderlo. Per accoppiarla, la si pone nella gabbia del maschio quando è in calore, condizione che si manifesta con la fuoriuscita di muco dalla vulva. Se la femmina è recettiva assume una posizione di lordosi (schiena incurvata verso il basso, arti posteriori allargati e coda alzata). Due giorni dopo l'accoppiamento si forma un abbondante scolo vaginale bianco-grigiastro. La gravidanza dura circa 16 giorni, il periodo di gestazione più breve tra i Mammiferi euteri, fatta eccezione per i Marsupiali. Il tempo medio per il parto è da 1,5 a 2,5 ore, durante il quale nascono 8-12 piccoli. Nei giorni precedenti e successivi al parto la femmina non deve essere disturbata, evitando di maneggiarla e di pulire la gabbia, altrimenti possono verificarsi casi di cannibalismo verso i piccoli o il loro abbandono. La femmina deve avere a disposizione abbondante materiale per fare il nido (sono consigliati fazzoletti di carta o carta da cucina, nel nostro caso è stato utilizzato il cotone) e una scorta di cibo sufficiente. I piccoli non vanno toccati per i primi sette giorni di vita. A volte le femmine, soprattutto se spaventate o disturbate, infilano i piccoli nelle tasche guanciali e li depositano nuovamente nel nido poco più tardi, quando pensano che il pericolo sia passato. Talvolta però i piccoli soffocano, soprattutto se la femmina è disturbata per un lungo periodo. I piccoli alla nascita sono completamente inetti, nudi e con gli occhi chiusi, ma presentano già gli incisivi. Lo svezzamento avviene a 20-25 giorni, anche se i piccoli iniziano ad assumere cibo solido prima (Clemens and Witcher, 1985; Huck and Lisk, 1985). La longevità dei criceti è relativamente breve, da 1.5 a 2 anni in media, ma possono vivere anche il doppio del tempo sia in cattività che in natura. Sono animali solitari, territoriali e molto aggressivi verso i conspecifici, tranne che durante l'accoppiamento. Il riconoscimento fra individui imparentati viene fatto attraverso i segni che hanno sul fianco. In inverno, i criceti dorati presentano un periodo di torpore che può essere indotto negli animali in cattività esponendoli a temperature inferiori agli 8°C (Gattermann et al., 2001; Burnie and Wilson, 2005). Questi roditori comunicano principalmente con l'odore di marcatura,

ma anche utilizzando una varietà di segnali uditivi, infatti, producono suoni scricchiolanti in diverse situazioni, in associazione con movimenti del corpo improvvisi. I criceti giovani sono in grado di produrre squittii ultrasonici che probabilmente sono importanti per la richiesta delle cure materne (Johnston, 1984). I criceti sono onnivori: in natura si nutrono di alimenti di tutti i tipi, sia vegetali, che animali (piante, semi, tuberi, insetti, frutta), anche se sono principalmente granivori, hanno cioè una preferenza verso i semi (Burnie and Wilson, 2005).

### III.2 Validità del modello sperimentale

Negli ultimi anni la ricerca preclinica ha focalizzato la sua attenzione sullo studio di potenziali farmaci anti-obesità in modelli animali il più possibile predittivi delle alterazioni fisiologiche e patologiche nell'uomo. Molti dei modelli di obesità finora utilizzati si basano su mutazioni a carico di geni che controllano il bilancio energetico come il topo omozigote *db/db* o il ratto Zucker affetto da diabete e obesità a causa di una mutazione genetica del *LepRb* (Lutz and Woods, 2012; Dalbøge et al., 2015). Sebbene tali animali risultano essere importanti nella ricerca sulle disfunzioni metaboliche quest'ultimi mostrano, ancora oggi, numerose limitazioni dal momento che non riescono a mimare le complesse interazioni tra fattori ambientali e poligenici coinvolti nello sviluppo dell'obesità e delle relative complicazioni (O'Rahilly and Farooqui, 2008). Tra queste limitazioni, l'alimentazione gioca sicuramente un ruolo preponderante. Secondo questa ottica, nell'ultimo decennio sono stati sviluppati i modelli di topi e ratti DIO, i quali non possiedono nessuna mutazione genetica, ma sono esposti ad un'alimentazione ad alto contenuto energetico che determina lo sviluppo di obesità. Questi modelli nonostante siano stati utilizzati con successo per lo studio dei disordini metabolici, associati molto spesso ad un'alterata tolleranza nei confronti del glucosio, non risultano essere resistenti allo sviluppo di ipercolesterolemia indotta da elevati livelli di colesterolo all'interno della dieta. Il criceto dorato siriano è, invece, un modello sperimentale ampiamente utilizzato nello studio del metabolismo lipoproteico. Contrariamente agli altri roditori questo modello animale presenta un profilo lipoproteico aterogenico con una notevole proporzione di lipoproteine circolanti come la proteina di trasporto degli esteri del colesterolo, il recettore che media l'assunzione di LDL e le apolipoproteine (apo) B-100 e l'(apo) B-48. Difatti, il criceto dorato sviluppa rapidamente ipercolesterolemia e ipertrigliceridemia in seguito all'assunzione di una dieta ricca di colesterolo (Tsutsumi et al., 2001; Russell and Proctor, 2008; Dillard et al., 2010) e ha dimostrato di avere una buona predisposizione allo sviluppo di obesità e resistenza insulinica

quando viene sottoposto ad una HFD e ad una dieta ricca di zuccheri (Srivastava et al., 2010; Dalbøge et al., 2015). Complessivamente, queste caratteristiche indicano il criceto come un ottimo modello sperimentale per la valutazione preclinica e la progettazione di nuovi farmaci da utilizzare nel trattamento di disordini metabolici.

### III.3 Procedura sperimentale

Nel presente lavoro sono stati utilizzati maschi di sette settimane forniti dalla *Charles River Laboratories* (Como, Italia). Durante tutto il periodo di stabulazione gli animali sono stati alloggiati in gabbie e mantenuti ad una temperatura di circa 20°- 22° C, ad un'umidità del 50%-60%, con cicli di 14 h di luce (6 h - 20 h) e 10 ore di buio (20 h - 6 h) controllati da un sistema automatizzato. Dopo un minimo di una settimana di acclimatazione, i criceti sono stati casualmente assegnati a due gruppi sperimentali: il primo (n=7-10/gruppo) alimentato con una HFD (60% di energia derivante da grassi, Harlan Laboratories, Indianapolis, USA, Tabella III.2), mentre il secondo gruppo (CTRL; n = 7-10/gruppo) con una dieta standard per roditori (Standard chow; Mucedola, Milano, Italia) per la durata di 12 settimane.

VALORI NUTRIZIONALI	% peso	% kcal
Proteine	23.5	18.4
Carboidrati	27.3	21.3
Grassi	34.3	60.3

Tabella III. 2 Contenuto energetico della HFD utilizzata per indurre una condizione di disordine metabolico.

Per verificare eventuali variazioni conseguenti all'assunzione di una dieta iperlipidica, ogni settimana sono stati monitorati la quantità di acqua e cibo consumati (*food/water intake*) e il peso corporeo (*body weight*), parametri indicativi per lo sviluppo di un fenotipo obeso. Parallelamente, sono stati, inoltre, valutati settimanalmente i comportamenti nella loro gabbia (*home-cage behaviors*) attraverso sessioni di osservazioni della durata di 15 min ciascuna (11:00 a.m., 2:00 p.m., 5:00 p.m.) al fine di valutare anche l'attività locomotoria oltre ad altri atteggiamenti tipici di

tali roditori come il sollevamento con le zampe posteriori (*rearing*), annusamento (*sniffing*), e pulizia corporea (*grooming*).

Nella seconda parte del mio lavoro, l'attenzione si è focalizzata sull'abilità dell'isoflavone DZ di attenuare le alterazioni neuro-comportamentali indotte dalla dieta HF. In questo caso altri due gruppi sperimentali, rispettivamente HFD+DZ e CTRL+DZ hanno ricevuto con la dieta (HFD o standard chow) DZ (200 mg DZ/kg dieta) per un periodo massimo di 30 giorni. Prima dell'aggiunta dell'isoflavone in polvere, il cibo è stato schiacciato e conglutinato in modo da produrre un cibo con lo stesso aspetto e la stessa compattezza per entrambi i gruppi sperimentali. Anche in questo caso ogni settimana il *feeding*, *drinking*, peso corporeo e *home cage behaviors* sono stati monitorati. Al termine dei trattamenti dietetici in assenza o in presenza del DZ i criceti sono stati sottoposti a diversi test comportamentali. La cura degli animali e le procedure sperimentali sono state condotte nel rispetto delle disposizioni etiche per la cura e l'uso di animali da laboratorio riportate nella legge legislativa n°26 (4-03-2014) e autorizzate dal Comitato Nazionale del Ministero della Salute Italiano riducendo al minimo la sofferenza degli animali e il numero di esemplari sacrificati.

### **III.3.1 Analisi comportamentale**

L'osservazione sperimentale ci permette di valutare in maniera analitica e al tempo stesso globale i diversi tipi di comportamento (attività motoria, *feeding*, esplorazione ecc..) tendendo sempre in considerazione l'influenza dello stato emotivo e attentivo, nonché le abilità mnemonico-cognitive del soggetto osservato. Negli ultimi anni numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sullo sviluppo dei disordini metabolici alla base degli stimoli emozionali, poiché molti ricercatori ritengono che l'obesità è un problema emotivo e/o comportamentale sia per gli effetti negativi che ha sulle *performances* cognitive e sia come risposta di tipo conscio a problemi esterni, che interagiscono con la particolare situazione interna di stress e confusione del soggetto (Roberts et al., 2003). Sulla base di tali premesse al fine di investigare gli effetti indotti da una dieta a base di grassi in assenza o aggiunta di DZ sullo stato d'ansia dei criceti e sulle loro abilità mnemonico-cognitive sono stati utilizzati specifici test come l'EPM, il NOR test e il CPP test.

### III.3.1.1 *Elevated plus maze test*

L'effetto del *HF-feeding* sul comportamento viene valutato tramite l'utilizzo dell'EPM (McNeilly et al., 2015). Il principio su cui si basa tale test ansiometrico è il conflitto provato dagli animali tra la curiosità di esplorare un ambiente nuovo e la riluttanza a quest'ultimo a causa delle sue caratteristiche aversive. Si tratta, infatti, di un test di emersione (*emergence test*) durante il quale l'animale si sposta da un'area ritenuta sicura ad un'area ritenuta pericolosa. L'apparato, sollevato 50 cm dal pavimento, presenta una piattaforma centrale quadrata, di 10 cm per lato dalla quale si dipartono 4 bracci disposti a croce: 2 bracci opposti aperti (50 cm × 10 cm) e 2 bracci chiusi da pareti (50 cm × 10 cm × 40 cm). Il perimetro della piattaforma è contrassegnato da linee che indicano il passaggio della stessa verso i bracci (Fig.III.2).

Lo strumento è posizionato in una stanza illuminata da una luce al neon priva di riferimenti visivi per evitare che questi possano influenzare l'osservazione. Il test viene preceduto da una fase di *habituation* al fine di consentire l'adattamento dell'animale in un ambiente nuovo.



Fig.III.2 *Elevated plus maze* (EPM) test.

Il comportamento è stato osservato da uno sperimentatore situato in una posizione tale da non influenzare la spontanea attività dell'animale e da una telecamera posizionata sopra l'apparato che registra l'intera osservazione. I parametri analizzati sono i seguenti:

- Tempo trascorso nei bracci aperti
- Tempo trascorso nei bracci chiusi
- Tempo trascorso in piattaforma centrale

- N° di entrate nei bracci aperti
- N° di entrate nei bracci chiusi
- N° di entrate totali

Sono state calcolate le percentuali di tempo trascorso nei bracci aperti  $[(\text{tempo nell'aperto}/\text{tempo totale}) \times 100]$ , nei bracci chiusi  $[(\text{tempo nel chiuso}/\text{tempo totale}) \times 100]$  e nella piattaforma centrale  $[(\text{tempo nella piattaforma}/\text{tempo totale}) \times 100]$  e la percentuale di entrate nei bracci aperti  $[(\text{entrate nell'aperto}/\text{entrate totali}) \times 100]$  e nei bracci chiusi  $(\text{entrate nel chiuso}/\text{entrate totali}) \times 100]$ . Per convenzione, l'entrata in un braccio è definita come l'attraversamento da parte dell'animale della linea che delimita la piattaforma centrale rispetto ai bracci con tutte e quattro le zampe; l'uscita da un braccio è definita come l'attraversamento con solo due zampe della linea che delimita il passaggio dai bracci alla piattaforma. Al termine di ogni test, l'apparato è stato pulito utilizzando etanolo al 70%.

### **III.3.1.2 *Novel object recognition test***

Il NOR test si basa sulla naturale e spontanea preferenza dei roditori a esplorare la novità e quindi ad interagire maggiormente con un oggetto nuovo piuttosto che un oggetto familiare. Sfruttando questa caratteristica è possibile andare a valutare la memoria di riconoscimento, ovvero l'abilità di riconoscere come familiare un oggetto con cui l'animale è venuto a contatto in precedenza rispetto ad un oggetto nuovo che gli viene presentato durante il test. La tendenza innata di esplorare un oggetto sconosciuto (Rose et al., 2013) è stata ampiamente utilizzata in diversi ambiti delle neuroscienze come la memoria, l'apprendimento, nello studio di alterazioni cerebrali durante l'invecchiamento e di patologie neurodegenerative (Leger and Massoud, 2013). L'apparato di questo test consiste di un'arena in plexiglas trasparente ( $L \times W \times H = 50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 27,5 \text{ cm}$ ) mentre gli oggetti sono due piccoli blocchi di plastica dello stesso materiale (Ennaceur, 2010) preferibilmente inodore (Heyser and Chemero, 2012). Dal momento che i roditori hanno difficoltà nel discriminare i colori, è importante considerare la luminosità e la consistenza degli oggetti. La scelta ideale si potrebbe basare sulla capacità di massimizzare la differenza tra gli oggetti senza indurre una preferenza per uno solo (Chemero and Heyser, 2005). Il primo oggetto (numero 1) ha una forma cuboidale, di colore bianco, rosso e giallo mentre il secondo oggetto (numero 2) ha una forma differente, di colore verde e rosso. Tali oggetti hanno un peso tale da impedire all'animale

di spostarli dalla loro posizione. Gli oggetti, inoltre, sono distanziati dalle pareti dell'arena ad una distanza di 10 cm consentendo all'animale di esplorare liberamente l'ambiente che lo circonda e non hanno alcuna rilevanza etologica per l'animale in quanto non sono associati ad un'esperienza di condizionamento (*reinforcement*).

### Il test prevede 3 fasi:

- Ambientamento (*habituation*): gli animali, dopo essere stati maneggiati per circa 2 minuti, vengono posizionati individualmente all'interno dell'arena senza gli oggetti. Si tratta di una procedura per ridurre lo stress ed evitare una potenziale risposta neofobica (Müller et al., 2015). Tale fase si ripete 3 volte/2 giorni consecutivi (1h di distanza l'una dall'altra) con una durata di 10 minuti/ogni *habituation*.
- Addestramento (*training*): alla fine della terza *habituation*, l'animale viene posizionato nell'arena nella zona opposta ai due oggetti identici e gli viene concesso di esplorare (ambiente e oggetti) per 5 minuti al termine dei quali viene riposto nella sua gabbia (Fig.III.3). Sebbene i roditori esplorano uno stimolo nuovo in un ambiente familiare, il tempo di esplorazione dipende da diversi fattori come lo stato dell'animale (Ennaceur et al., 2005), la specie (van Goethem et al., 2012) e l'ambiente (Muller et al., 2015) mentre il comportamento esplorativo potrebbe essere influenzato, anche dal ritmo circadiano e dal ciclo sonno/veglia. Si definisce esplorazione l'avvicinamento con il muso dell'animale ad una distanza minore o uguale a 2 cm (Gaskin et al., 2010).

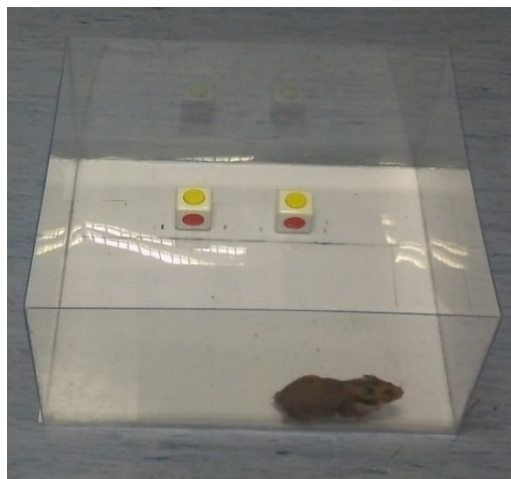


Fig.III.3 *Training del Novel object recognition (NOR).*

*Climbing over* e *sitting* sull'oggetto non vengono considerati parametri che indicano un comportamento esplorativo (Besheer and Bevins, 2000; Wilkinson and Goodyer, 2006).

- il *test*: questa fase viene eseguita un'ora dopo il *training*. L'animale viene lasciato libero di esplorare l'arena con la presenza di due oggetti differenti, il primo definito "familiare" dal momento che era stato precedentemente utilizzato nella fase di *training*, il secondo completamente nuovo, per forma e colore, posizionati uno accanto all'altro (Fig.III.4). La localizzazione degli oggetti è stata randomizzata in ogni sessione. Il test ha la durata di 5 minuti e l'esplorazione non può essere prolungata per un tempo maggiore in quanto potrebbe comportare un rapido declino dell'osservazione (Clarke et al., 2000).

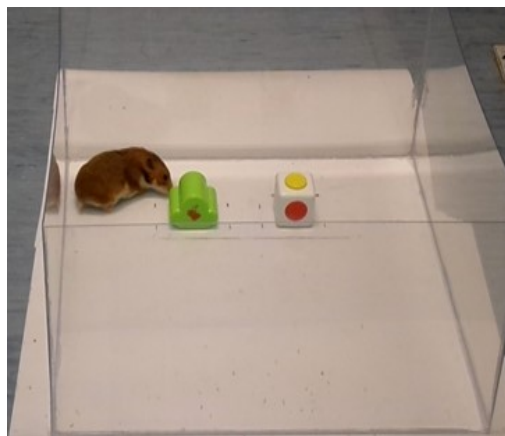


Fig.III.4 Test del *Novel object recognition* (NOR).

Tutte le sessioni vengono registrate mediante una videocamera ad alta risoluzione Waterproof Action Camera (DBPOWER- SJ4000 SPORTS HD DV) posizionata ad una determinata distanza dall'arena sotto la quale viene posto un foglio bianco al fine di rafforzare il contrasto ed evitare la translucidità nel video. La superficie dell'arena e gli oggetti in esame vengono puliti prima e subito dopo le sessioni con etanolo al 70% per evitare che l'odore possa causare delle alterazioni. La capacità di ricognizione può essere valutata dal seguente indice:

$$DI (\%) = \frac{\text{tempo di esplorazione del nuovo oggetto} - \text{tempo di esplorazione dell'oggetto familiare}}{\text{tempo totale di esplorazione di entrambi gli oggetti}} \times 100$$



Tale parametro è noto come *indice di discriminazione* (DI) il quale considera le differenze interindividuali nella quantità totale di esplorazione in esame (Akkerman et al., 2012b; van Goetham et al., 2012). Il DI può assumere un valore che va da 1 (esplorazione esclusiva del nuovo oggetto) a -1 (esplorazione esclusiva dell'oggetto familiare) e un valore positivo riflette una buona funzione mnemonica (Ennaceur et al., 2005; Van Goetham et al., 2012). I video delle sessioni registrate durante la fase di *training* e di test sono stati analizzati con il software Etholog (version 2.2.5; Visual Basic, São Paulo, Brazil).

### III.3.1.3 *Conditioned place preference test*

Il CPP è un test mnemonico che sfrutta il principio dell'apprendimento basandosi sullo spostamento nei diversi compartimenti caratterizzanti l'apparato. Tale test sfrutta l'associazione mentale tra un evento di ricompensa, come per esempio la scelta di un cibo particolare o una droga, e la localizzazione o il contesto ambientale dove l'animale ha precedentemente sperimentato la ricompensa dello stimolo (Figlewicz et al., 2004; Facciolo et al., 2012). Quest'apparato (Fig.III.5) consta di due camere uguali in plexiglass (74 cm di lunghezza, 57.4 cm di larghezza, 24.7 cm di altezza) e di una zona di collegamento, con un muro divisorio removibile posto al centro. I due lati delle camere sono resi distinguibili da colori e materiali differenti e dall'orientazione di strisce poste in posizione verticale applicate alle pareti.

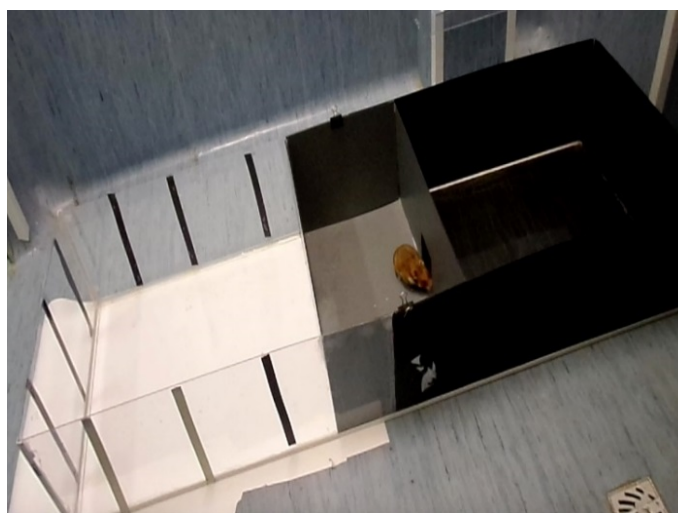


Fig.III.5 Rappresentazione del *Conditioned place preference* (CPP) test.

**Il test prevede tre fasi:**

- *habituation (baseline session)*: gli animali vengono posizionati individualmente all'interno del maze e, dopo aver rimosso la parete divisoria, vengono lasciati liberi di esplorare l'intero apparato per 10 minuti. Il tempo trascorso in ciascuna arena viene registrato dallo sperimentatore e il lato in cui l'animale trascorrerà meno tempo diventerà la camera associata al cibo (*food-paired context*) mentre il lato di preferenza sarà l'ambiente non associato all'evento gratificante (*non-food- paired context*).
- *training*: questa parte ha durata di sei giorni consecutivi (una sessione di 20 minuti al giorno) in cui per tre sessioni il criceto è stato isolato nell'arena associata al cibo (*food-paired context*) e per le altre tre sessioni è stato isolato nell'arena completamente vuota (*non-food- paired context*). L'ordine delle sessioni è stato alternato.
- *test*: è stato eseguito dopo due giorni dall'ultima sessione di *training* e l'animale posto nel *maze*, senza parete divisoria e senza presenza di cibo, è stato lasciato libero di esplorare tutte le camere per 15 minuti.

La variabile dipendente utilizzata per l'analisi del CPP è stata il punteggio di preferenza (*preference score*):

$$\text{Preference Score} = \frac{\text{tempo trascorso nella camera associata al cibo}}{\text{tempo totale trascorso nell'apparato}}$$

Tale indice è dato dal rapporto tra il tempo trascorso nell'ambiente associato al cibo e il tempo totale trascorso nell'apparato durante i 10 minuti di *baseline session* e durante i 15 minuti di *test*. Se l'animale passa più tempo nella camera associata al cibo si deduce che il consolidamento mnemonico ha avuto un effetto soddisfacente e l'animale, cambiando il suo lato di preferenza, ha manifestato una buona capacità mnemonica.

**III.4 Prelievo ed Analisi Ematiche**

Al fine di procedere con le analisi morfo-strutturali e molecolari in distinte aree encefaliche, gli animali sono stati sacrificati e i cervelli sono stati rapidamente rimossi. Nella sezione cerebrale di interesse, identificata mediante l'ausilio dell'atlante di Morin and Wood (2001), il prelievo

dell'area (HIP, HTH, AMY) è stato effettuato sia a carico dell'emisfero destro che sinistro. Le aree cerebrali dopo essere state prelevate sono state poi congelate in azoto liquido e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino all'utilizzo, mentre il cervello intero è stato conservato a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Allo stesso tempo è stato eseguito il prelievo del sangue in modo da correlare il quadro lipidemico a parametri reputati indicatori specifici nell'insorgenza dei disordini metabolici. Allo stesso tempo è stata effettuata l'asportazione del fegato e del grasso addominale per confermare come tale cambiamento morfologico non solo può incidere sui valori ematici ma anche a livello di tessuti considerati bersagli specifici nell'obesità. I campioni di sangue sono stati raccolti in tubi eparinizzati e immediatamente centrifugati. Il siero è stato quindi decantato e conservato a  $4^{\circ}\text{C}$ . I livelli sierici dei seguenti parametri molecolari: i TRIG, il colesterolo totale (TC) e il glucosio sono stati misurati utilizzando i metodi colorimetrici enzimatici (CHOD-PAP, GPO-PAP, GOD POD) secondo il protocollo del produttore (BIOGRAMMA SRL, BIOTECNICA INSTRUMENTS, Roma, Italia). Le analisi ematiche sono state effettuate in collaborazione con la Dott.ssa Rosalinda Bruno presso il Laboratorio di Analisi del Centro sanitario, dell'Università della Calabria.

### III.5 Analisi neurodegenerativa mediante *Amino Cupric Silver Stain* (ACS)

L'ACS è una colorazione istologica che consente la valutazione del danno neurodegenerativo a uno stadio avanzato senza tuttavia distinguere tra processi apoptotici e necrotici. Tale tecnica sfrutta la capacità dei sali d'argento di reagire con i neuroni degenerati, depositandosi in essi e venendo ridotti ad argento metallico. Per tale procedura, gli encefali di *Mesocricetus auratus* congelati a  $-40^{\circ}\text{C}$  per tutti i trattamenti sperimentali considerati in questo studio sono stati tagliati al criostato in sezioni di  $30\ \mu\text{m}$ , conservate a  $4^{\circ}\text{C}$  fino all'utilizzo.

Il protocollo sperimentale dell'ACS prevede i seguenti passaggi sperimentali:

- **Pre-impregnazione:** le sezioni sono state immerse in una soluzione P di *Preimpregnazione* (nitrato d'argento, acqua distillata, dl-alanina, nitrato di rame 0.5%, nitrato di cadmio 0.5%, nitrato di lantanio 0.5%, rosso neutro 0.5%, piridina, trietanolammina, isopropanolo) a  $50^{\circ}\text{C}$  per 50 min e successivamente raffreddate a  $T_a$  per 2-3 h;
- **Impregnazione:** le sezioni sono state risciacquate in acetone per 30 s ed immerse nella soluzione I di *Impregnazione* (nitrato d'argento, acqua distillata, EtOH 100%, acetone, idrossido di litio 0.4%, idrossido d'ammonio) per 45 min in costante agitazione;

- **Riduzione:** le sezioni sono state trasferite in una soluzione R di *Riduzione* (formalina 10%, acido citrico monoidrato 1%, EtOH 100%, acqua distillata) a 32°C per 25 min, cui vengono aggiunti, a intervalli di 5 min e per 4 volte, 0.3 ml della soluzione I. I tessuti sono dunque trasferiti in acqua distillata e poi in acido acetico. Dopodiché è stato eseguito uno sciacquo in acqua per 1 h ed immersione overnight in acqua distillata;
- **Chiarificazione:** le sezioni sono state ricoperte con la soluzione C1 di *Chiarificazione* (ferrocianuro di potassio 6%, clorato di potassio 4%, acido lattico) per 90 s a T<sub>a</sub>. Dopo uno sciacquo in acqua distillata, esse sono state ricoperte per 90 s in soluzione C2 di *Chiarificazione* (permanganato di potassio 0.06%, acido solforico 6%) e trasferite in acqua distillata (2 cambi) per 3 min a T<sub>a</sub>;
- **Stabilizzazione:** le sezioni sono state trasferite in soluzione acquosa di tiosolfato di sodio 2%, agitate per 2 min e risciacquate in acqua distillata per 3 min; in seguito esse sono state trasferite in Rapid Fixer (Kodak) per 4 min e, dopo sciacquo in acqua distillata, immerse per 20 min in rosso neutro 0.5%. Al termine della colorazione in rosso neutro, i tessuti sono stati disidratati (in alcol 50%, 70%, 95%, 100%) e sottoposti a differenziazione con una miscela di alcol-xylene (1:1), per completare con due immersioni in xylene puro e montaggio con DPX per l'osservazione al microscopio ottico.

### III.6 *Western blotting*

Tramite *western blotting*, tecnica immunologica ampiamente utilizzata nel campo della biologia molecolare è stato possibile indagare l'effetto dei diversi trattamenti sull'espressione di NTR1 e IL-10 in alcune aree cerebrali di interesse quali HTH, HIP e AMY. Subito dopo la dissezione, le suddette aree sono state omogenizzate in un buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, Triton X-100 da mM, glicerolo 10%, EDTA 2 mM), contenenti un cocktail di inibitori di proteasi, per 10 min a 4°C. I campioni sono stati poi centrifugati a 13000 rpm, a 4°C, per 20 minuti. Il sovrantante è stato recuperato e conservato a -80°C per la successiva analisi immunologica. Le concentrazioni delle proteine estratte sono state determinate usando il saggio proteico Bradford (Bio-Rad Laboratories). Gli estratti tissutali (40 µg o 80 µg) sono stati aggiunti a 8 µl di tampone di caricamento e denaturati per 7 minuti a 95°C. Marcatori di peso molecolare preconfezionato della proteina (Thermo Scientific) e estratti proteici di tessuto sono stati separati tramite l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) al 10% o il 15% a 100 V per 1,5 o 2 ore.

Le proteine risolte sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa e bloccate con albumina sierica al 5% per 1h. Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate per una notte a 4 ° C con i seguenti anticorpi: rabbit polyclonal anti NTR-1 (H-130; sc-15311, 1:500, Santa Cruz Biotechnology), rat monoclonal anti-IL-10 (JES5-2A5; ab33471, 1:500, Abcam), goat polyclonal anti- $\gamma$ -Tubulin antibody (C-20; sc-7396, 1:2000, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (ab8226, 1:500, Abcam). I blots sono stati quindi incubati con l'anticorpo secondario di capra [goat anti-rabbit (P044801-2, Dako), goat anti-rat (GTX77339, GeneTex) o goat anti-mouse (P044701-2, Dako)] coniugato con perossidasi di rafano (HRP; P044801-2, Dako). Il kit di chemiluminescenza della perossidasi di rafano aumenta il luminol e i reagenti ossidanti i quali svolgono la funzione di incrementare i segnali del blot. La densitometria è stata ottenuta tramite sistema di rivelazione a chemiluminescenza potenziata (Bio-Rad Laboratories). I dati relativi a tale analisi sono stati valutati con il software NIH Image J. L'espressione delle proteine target è stata normalizzata con i valori di densità ottica ottenuti per le proteine  $\gamma$ -Tubulina e  $\beta$ -actina. Ogni *western* è stato eseguito in triplicato.

### III.7 Analisi statistica

I trattamenti e le successive analisi comportamentali sono stati effettuati su un minimo di 7 esemplari per gruppo sperimentale e ciascun esperimento è stato condotto in duplicato. Per l'analisi neurodegenerativa l'osservazione al microscopio è stata condotta su almeno 6 sezioni encefaliche di un minimo di 3 esemplari diversi per trattamento. Nel caso dell'analisi molecolare, invece, sono state utilizzate le aree di encefali di almeno 4 esemplari e i *western* ripetuti in triplicato. I dati ottenuti dalle suddette indagini sono stati elaborati e sottoposti a specifiche analisi statistiche quali ANOVA *one-way* seguita da *Newman Keuls Multiple Range post hoc Test* quando il confronto è risultato  $p < 0,05$ .

# CAPITOLO IV

## RISULTATI

### IV.1 Effetti di HFD sul *feeding/drinking* e *home cage behaviors*

In questa prima parte delle osservazioni comportamentali, alcuni esemplari di *Mesocricetus auratus* esposti ad una HFD sono stati monitorati ogni settimana per evidenziare il tipo di effetto indotto dalla dieta sul *body weight* e sulle abitudini alimentari rispetto ai CTRL. Per tale obiettivo sono stati considerati la *feeding duration*, ovvero il tempo speso a mangiare, ed il *food/water intake* in cui sono state misurate quantità di cibo ed acqua assunti nel corso delle 12 settimane di trattamento. Per quanto concerne il monitoraggio del *body weight* (Fig.IV.1), si osserva un moderato incremento del peso corporeo in animali HFD, a partire dalla quinta settimana (+31%) che è risultato più accentuato (+55%) alla decima settimana per poi assestarsi attorno a +62% alla dodicesima settimana di trattamento rispetto ai CTRL.

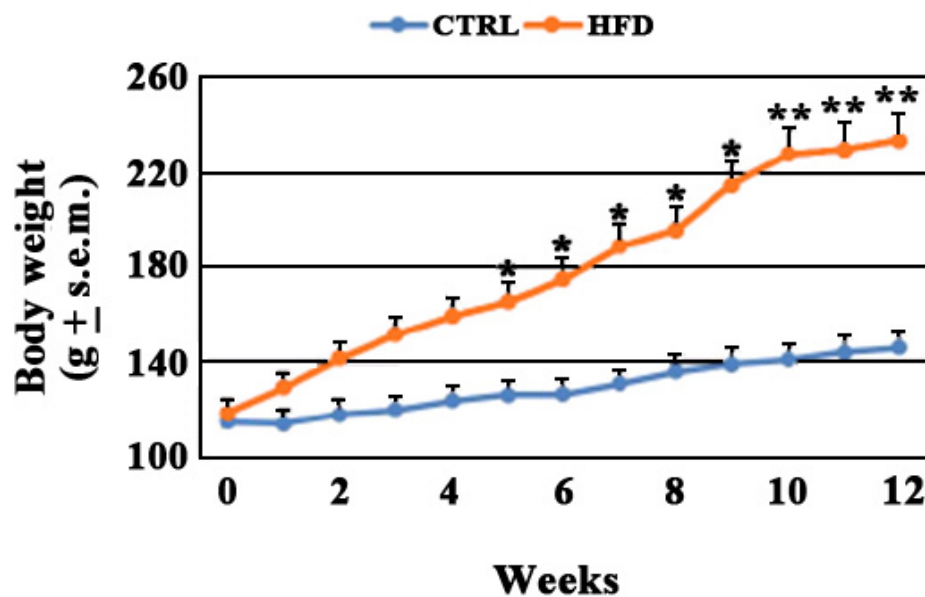


Fig.IV.1 Effetti della HFD sul *body weight*. La variazione del peso corporeo è espressa come media dei grammi ( $g \pm s.e.m.$ ) acquisiti dal gruppo HFD ( $n=7/10$ ) rispetto ai CTRL ( $n=7/10$ ). Le differenze significative sono state ottenute mediante analisi ANOVA e successivamente confrontate con *Newman-Keuls Multiple Range post hoc Test* quando  $p<0.05$ . \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

Contrariamente, il *food intake* registrato durante tale periodo ha indicato un sensibile decremento (-30%) da parte degli animali HFD nella quarta settimana di osservazione rispetto ai CTRL (Fig.IV.2). È interessante notare che tale riduzione continua a persistere per tutta la durata delle osservazioni, suggerendo come l'aumento del peso corporeo non sembra essere dovuto alla quantità di cibo assunto ma al ricco contenuto energetico della dieta iperlipidica.

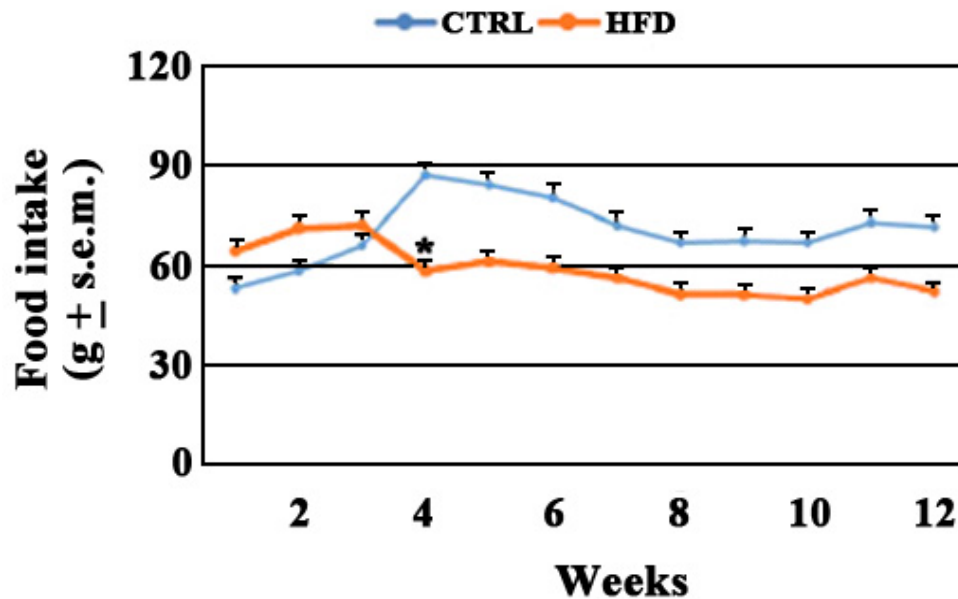


Fig.IV.2 Effetti della HFD sul *food intake*. I dati, riportati come media della quantità (g ± s.e.m.) di cibo ingerito dagli animali sottoposti a dieta iperlipidica rispetto ai CTRL, sono stati confrontati mediante analisi statistiche come indicato in Fig. 1; \*p<0.05.

Allo stesso tempo è stata effettuata una valutazione della *feeding duration* (Fig.IV.3) da cui è emerso un trend simile al *food intake* negli animali trattati con la dieta ipercalorica, come si può notare da una consistente diminuzione (-55%) di tempo dedicato a tale attività fisiologica per tutto il periodo di trattamento rispetto ai CTRL. Queste indicazioni tendono, ulteriormente, a rafforzare la tesi sulla qualità del cibo quale fattore primordiale, e non tanto i ritmi del *food intake*, alla base dei cambiamenti morfologici dei criceti iperlipidemici.



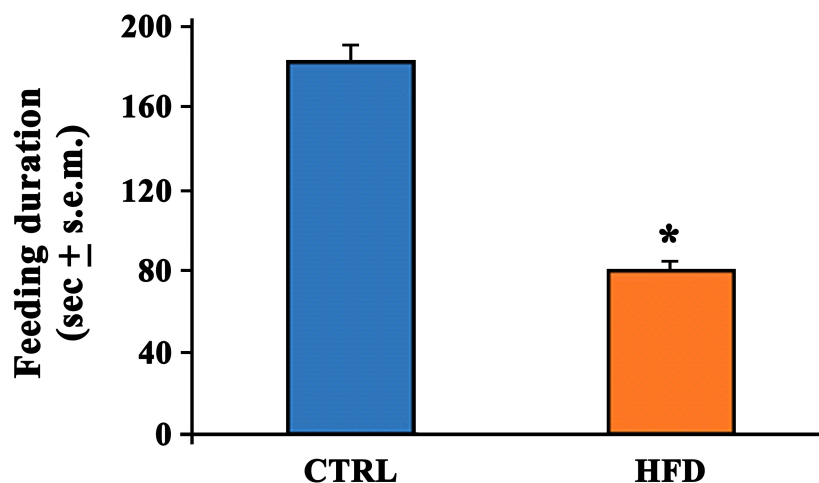


Fig.IV.3 Effetti della HFD sulla *feeding duration*. Il tempo medio (sec ± s.e.m.) speso a mangiare dagli HFD rispetto ai CTRL, è stato valutato mediante analisi statistiche come indicato in Fig. 1; \* $p < 0.05$ .

Il *drinking behavior* ha fornito tendenze alterate comparabili al *feeding*, nonostante i maggiori cambiamenti siano emersi solo a partire dalla sesta settimana, come si evince dall'assenza di alcun effetto sul *water intake* all'inizio di tale intervallo. In modo specifico si tratta di un moderato decremento (-30%) di H<sub>2</sub>O assunta rispetto ai CTRL (Fig.IV.4), che poi risulta più marcato (-60%) a partire dalla decima settimana fino alla fine del trattamento.

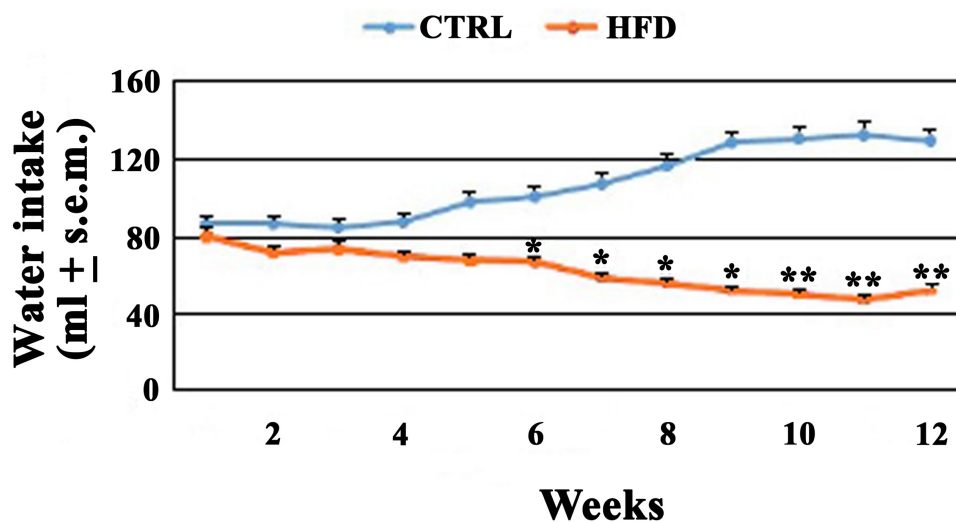


Fig.IV.4 Effetti della dieta HFD sul *water intake*. I valori medi di acqua (ml ± s.e.m.) assunta dagli animali sottoposti a dieta iperlipidica rispetto i CTRL, sono stati valutati mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 1; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Nel caso dei differenziati atteggiamenti manifestati dagli animali HFD all'interno della gabbia quali *grooming*, *rearing*, *sniffing* e vari movimenti spontanei, considerati essenziali per la determinazione della *locomotor activity*, è emerso in maniera simile al *feeding behavior*, un notevole decremento (-62%) di tali attività oltre ad ostacolare la loro capacità esplorativa rispetto ai CTRL (Fig.IV.5).

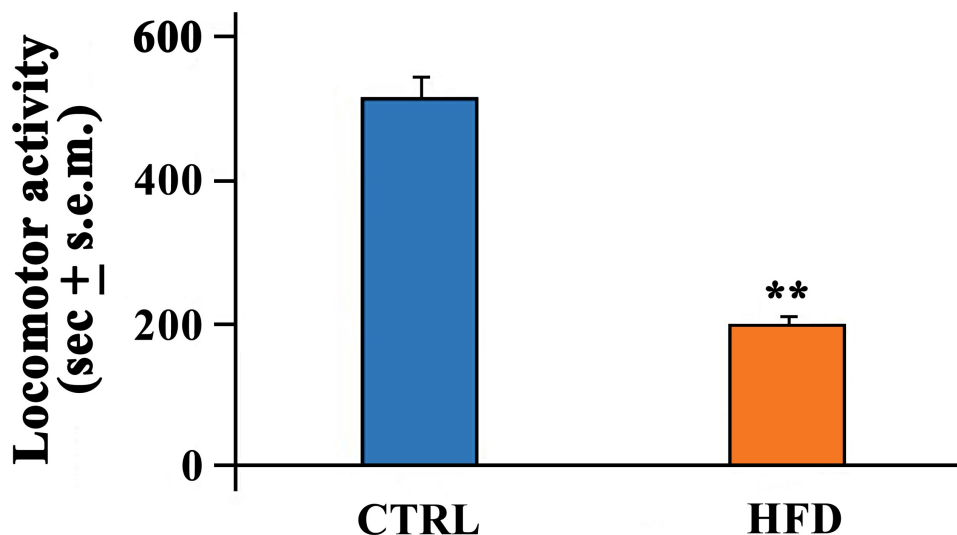


Fig.IV.5 Effetti della HFD sulla *locomotor activity*. Il tempo medio (sec ± s.e.m.) trascorso a muoversi nella gabbia dagli HFD rispetto ai CTRL, è stato valutato mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 1; \*\*p<0.01.

#### IV.1.2 Effetti della HFD sull'induzione di *anxiety-like behaviors*

È interessante notare che le indicazioni derivanti dall'EPM, test specifico per la determinazione dei diversi stati emotivi, non ha rilevato consistenti risposte ansiolitiche/ansiojeniche negli animali iperlipidemici rispetto ai CTRL. Difatti, i criceti trattati con una HFD non hanno mostrato alcuna variazione significativa nel numero di entrate e uscite dai diversi bracci (*total arms entries*) rispetto ai CTRL (Fig.IV.6B), mentre è emersa solo una lieve preferenza per i bracci chiusi (*closed arms*) da parte degli animali iperlipidemici (Fig.IV.6A), che tuttavia non è risultata statisticamente significativa.

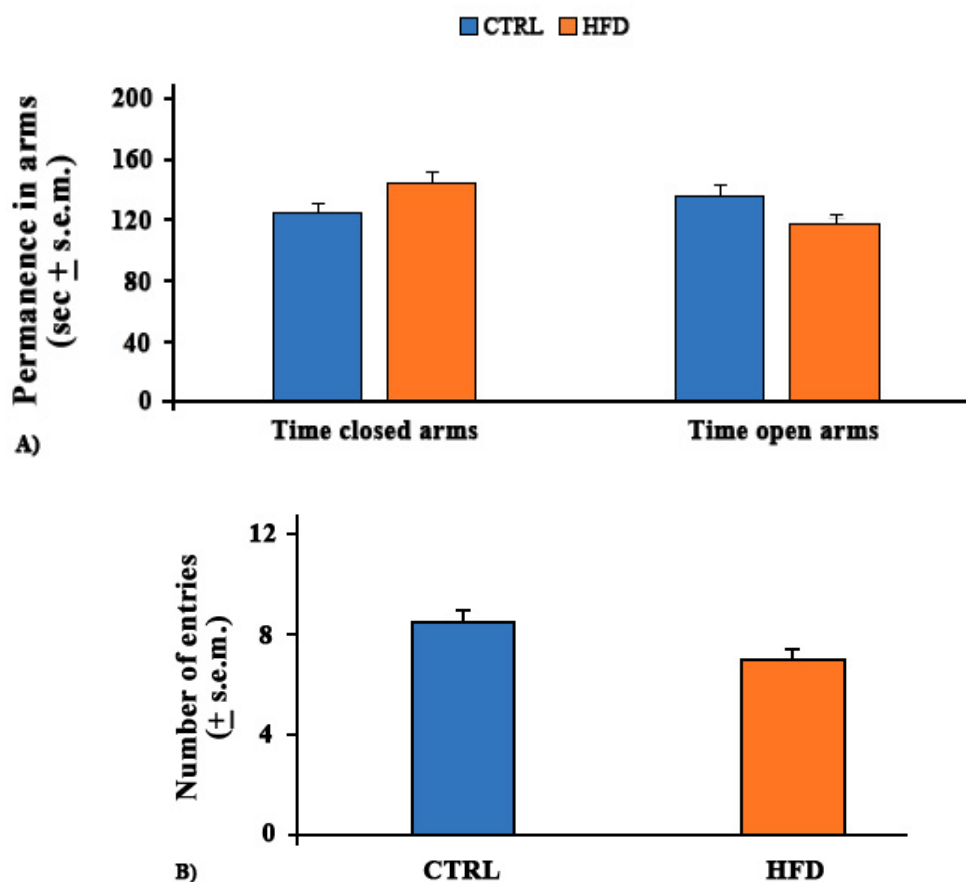


Fig.IV.6 Effetti di una dieta HFD sul (A) tempo di permanenza (sec  $\pm$  s.e.m.) in *open arms* (bracci aperti) e *closed arms* (bracci chiusi) oltre al (B) numero di entrate ( $\pm$  s.e.m.) nell'EPM. Il tempo medio (sec  $\pm$  s.e.m.) trascorso nei due bracci dell'EPM rispetto alla durata totale del test (300 sec) e il valore medio di entrate totali degli HFD rispetto ai CTRL, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 1.

### IV.1.3 Effetti di HFD sulle funzionalità cognitive

Dalle analisi del NOR test, è estremamente interessante che i criceti trattati con HFD non hanno mostrato alcuna preferenza per il nuovo oggetto, nel corso dei cinque minuti di test (Fig.IV.7), come si evince dal notevole decremento del DI (-152%) rispetto ai criceti non trattati (CTRL) che al contrario hanno, invece, esibito una maggiore tendenza esplorativa verso oggetti nuovi.

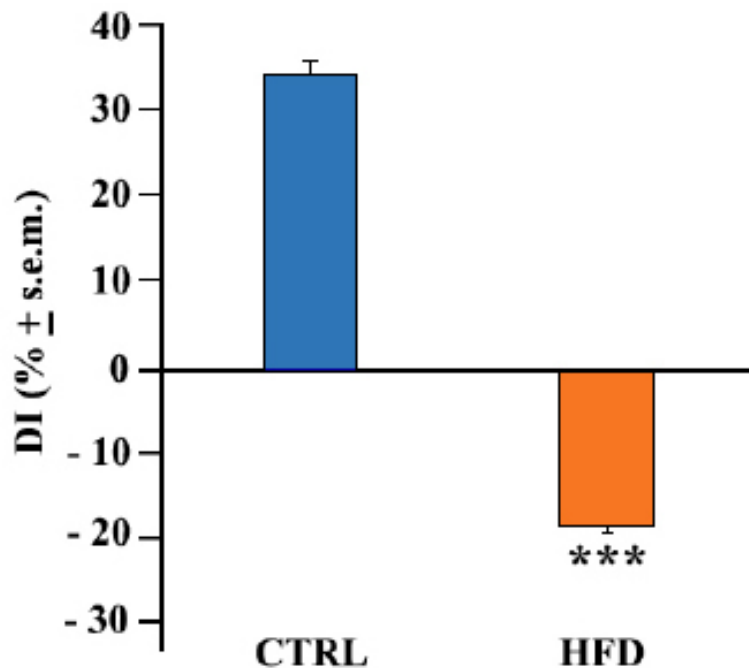


Fig.IV.7 Effetto della HFD sul NOR test. Il DI ( $\pm$  s.e.m.) espresso in percentuale viene calcolato come differenza tra il tempo di esplorazione del nuovo oggetto e l'oggetto familiare rispetto al tempo totale di esplorazione di entrambi gli oggetti nei due gruppi sperimentali. La significatività riscontrata è stata ottenuta mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 1; \*\*\* $p < 0.001$ .

Al fine di individuare meglio gli effetti della dieta iperlipidica sulle abilità mnesiche, è stato eseguito un'ulteriore test quale il CPP, il cui *training* è finalizzato ad un consolidamento mnemonico a lungo termine. Anche in questo caso la dieta HF ha influito negativamente sulle *performance* cognitive dei criceti che hanno mostrato un sensibile decremento (-35%) del *preference score* verso la *food-paired* area rispetto ai CTRL (Fig.IV.8). Tale tendenza dimostra una ridotta capacità cognitiva e mnemonica, in quanto a differenza dei CTRL, l'animale HFD sembra non ricordare l'evento gratificante.

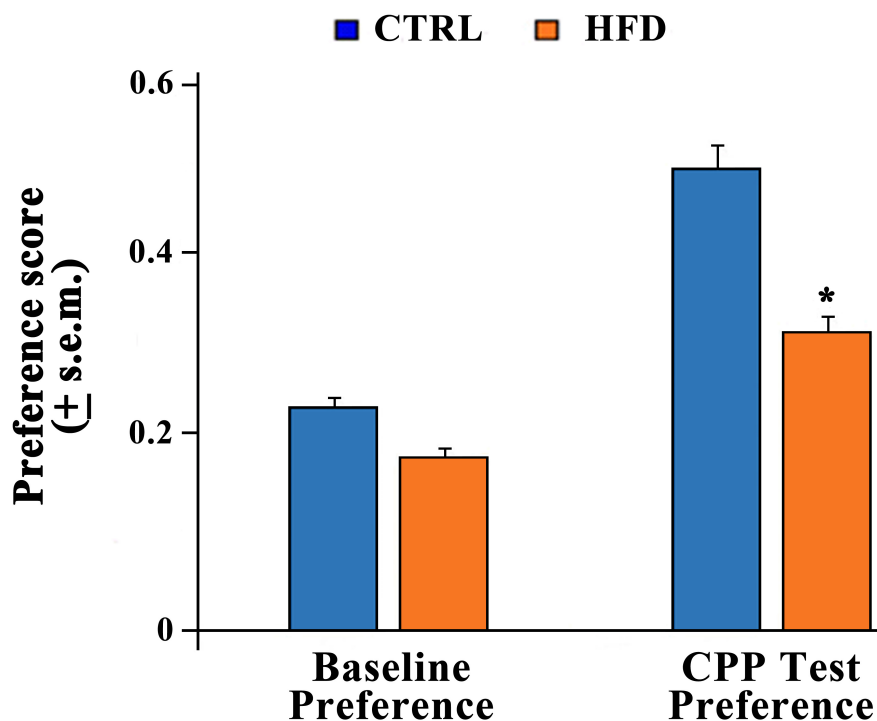


Fig.IV.8 Effetto di una HFD sul *CPP* test. I valori medi di *preference score*  $\pm$  s.e.m. (numero di sec nell'area food-paired/sec totali) sono stati calcolati rispettivamente durante la *baseline* e la *test session* degli HFD rispetto ai CTRL, e le differenze sono state valutate mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 1; \* $p < 0.05$ .

#### IV.2 Effetti del DZ sul *feeding/drinking* e *home-cage performances* in criceti HFD

In questa parte si è cercato di stabilire se le proprietà nutrizionali/antiossidanti del DZ potessero essere estese anche alla regolazione delle attività del *feeding/drinking* dei criceti iperlipidemici oltre ai vari comportamenti condotti nella loro gabbia. Difatti, la somministrazione di DZ a criceti HFD di riferimento (*baseline*), nei quali era stato osservato un incremento di *body weight* rispetto ai loro CTRL (*baseline*), ha abolito tale effetto rispetto al solo gruppo HFD (*baseline*) in modo significativo dopo 30 giorni di trattamento come si può notare dalla moderata riduzione (-37%) del peso corporeo (Fig. IV.9). Al contrario, a 15 giorni di trattamento con il DZ non è stata riscontrata alcuna diminuzione significativa rispetto al gruppo HFD (*baseline*).

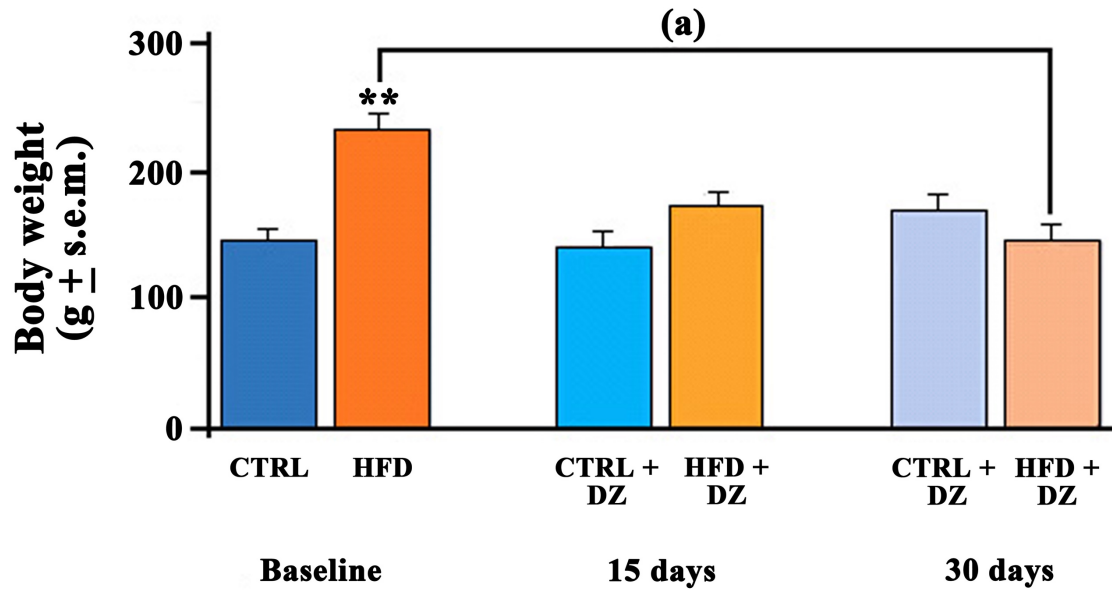


Fig.IV.9 Effetti del DZ sul *body weight* di criceti HFD. Le differenze significative del *body weight* di criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere) sono state ottenute mediante ANOVA e successivamente confrontate con *Newman-Keuls Multiple Range post hoc Test* quando  $p < 0.05$ ; <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ .

L'effetto positivo del DZ è stato riscontrato anche nel caso del *feeding behavior* come si evince dal notevole incremento della *feeding duration* (+96%) già dopo 15 giorni di somministrazione rispetto ai criceti *baseline* trattati con HFD (Fig.IV.10) i quali mostrano valori di tale parametro paragonabili ai livelli non solo del rispettivo CTRL+DZ ma anche rispetto al CTRL *baseline*. Tale tendenza si è mantenuta anche fino a 30 giorni come si può osservare dal simile incremento (+104%) della *feeding duration* rilevato a 15 giorni.

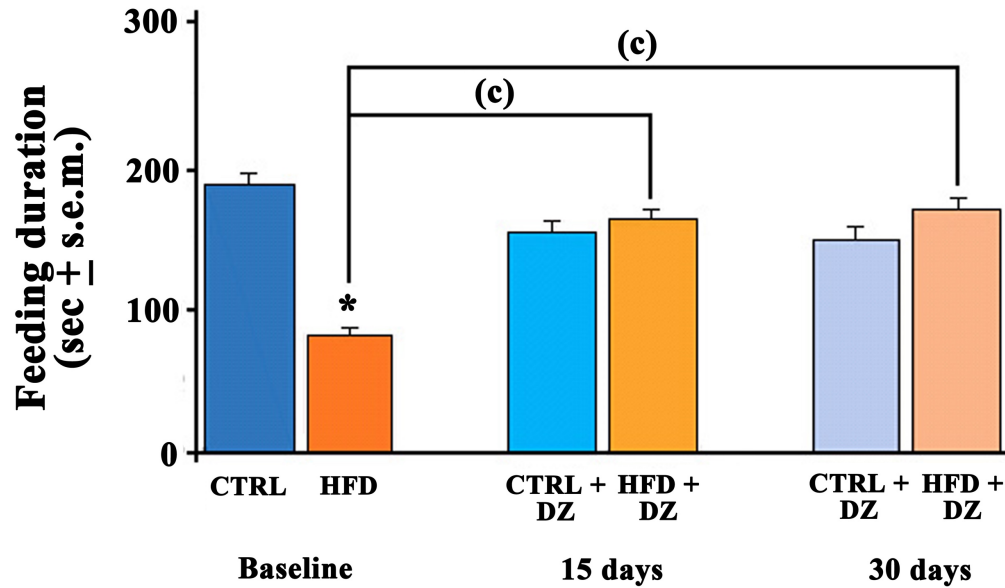


Fig.IV.10 Effetti del DZ sulla *feeding duration* di criceti HFD. Il tempo medio (sec.  $\pm$  s.e.m.) speso a mangiare dagli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere) è stato valutato mediante analisi statistiche come indicato in Fig. 9; \* $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> $p < 0.001$ .

Similmente, il DZ ha indotto un miglioramento anche nelle *performances* motorie. In questo caso i comportamenti, quali *rearing*, movimenti spontanei e l'attività esplorativa, sono risultati più pronunciati (+90%), dopo 30 giorni di trattamento, non rispetto ai loro CTRL bensì rispetto agli animali trattati con HFD (Fig.IV.11). Per quanto concerne gli animali trattati con l'isoflavone dopo 15 giorni, sembrerebbe che questo fitoestrogeno non avesse esercitato alcun effetto rispetto agli animali HFD tranne un moderato incremento (+30%) di tale attività registrato in questo periodo.

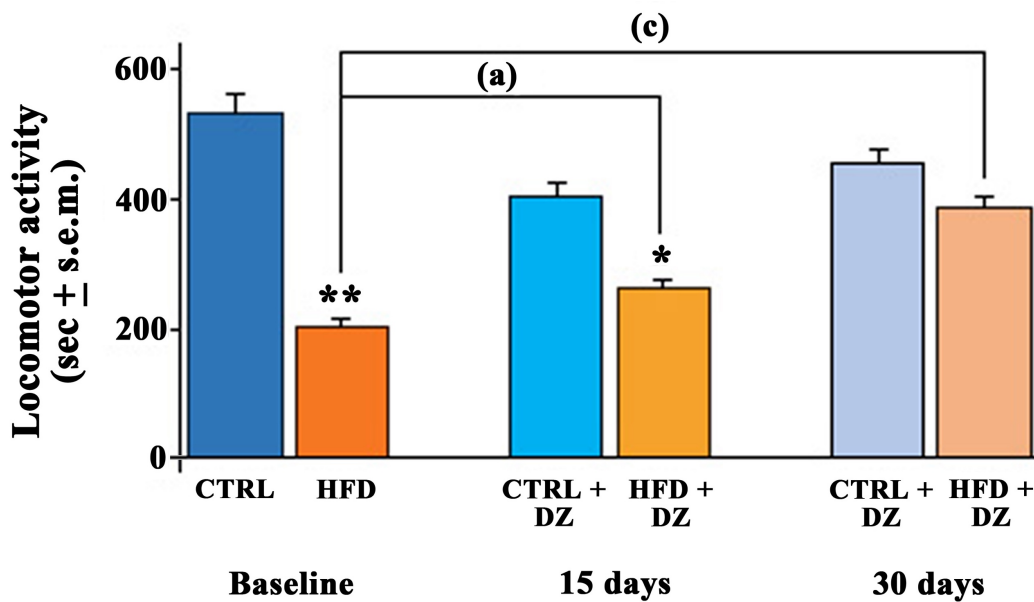


Fig.IV.11 Effetti del DZ sulla *locomotor activity* di criceti HFD. Il tempo medio ( $\pm$  s.e.m.) speso a svolgere diverse attività motorie da parte degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), è stato valutato mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 9;  $^{*a}p<0.05$ ;  $^{**}p<0.01$ ;  $^c p<0.001$ .

#### IV.2.1 Effetti del DZ sugli *anxiety-like behaviors*

Conseguentemente, è risultato interessante stabilire anche il ruolo del DZ sullo stato emotivo dei criceti HFD alla luce del recupero determinato dal fitoestrogeno sulle *performances* motorie e sul *feeding*; capacità che è stata verificata mediante la determinazione degli *anxiety-like behaviors* nell'EPM. Anche in questo caso, l'isoflavone ha esercitato un'azione protettiva in criceti HFD già a 15 giorni di trattamento come si è potuto osservare dalla moderata riduzione di permanenza nei *closed arms* (-35%; caratteristica di comportamenti *anxiety-like*) rispetto ai criceti HFD; riduzione che risulta essere ancora più bassa dei CTRL. L'azione di recupero da parte del fitoestrogeno sul comportamento alterato dei criceti HFD viene, inoltre, evidenziata da una maggiore permanenza negli *open arms*, anche se in maniera non significativa (Fig. IV.12A). Nello stesso tempo, è stata registrata nei criceti HFD trattati con il DZ una maggior attività esplorativa all'interno del *maze*, suggerendo un comportamento del tipo *non-anxiety like*, come dimostrato da un evidente numero di entrate nelle differenti braccia (+57%) rispetto al gruppo HFD (Fig.IV.12B).



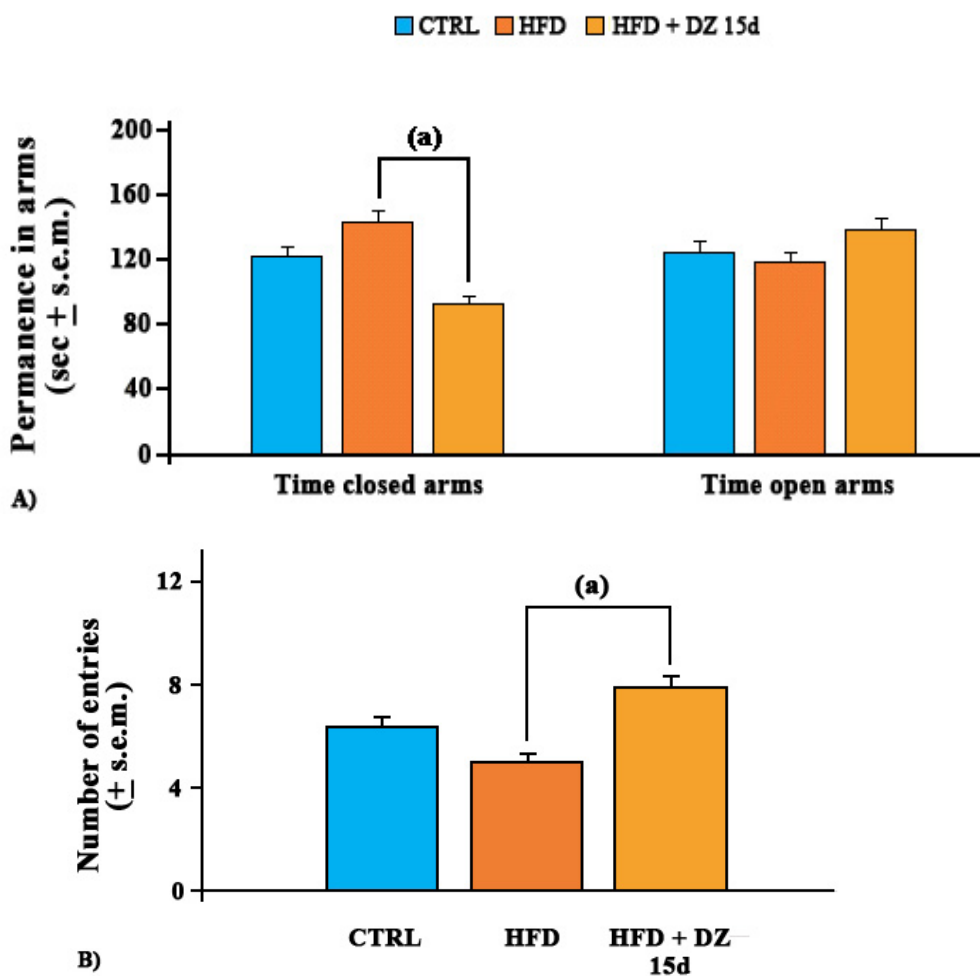


Fig.IV.12 Effetti del DZ in criceti HFD sul (A) tempo di permanenza (sec ± s.e.m.) in *open* e *closed arms* oltre al (B) numero di entrate (± s.e.m.) nell'EPM dopo 15 giorni di trattamento. Il tempo medio trascorso nei due bracci dell'EPM rispetto alla durata totale del test (300 sec) e il valore medio di entrate totali degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), sono stati ottenuti mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 9. Per tale analisi, i rispettivi controlli del gruppo HFD e del gruppo HFD+DZ sono comparabili e quindi per evitare confusioni nelle diverse correlazioni è stato usato solo il valore medio relativo al CTRL + DZ; <sup>a</sup>p<0.05.

Una simile tendenza è stata riportata anche dopo 30 giorni di esposizione in cui il DZ ha continuato a ridurre la permanenza (-44%) nei *closed arms* negli animali HFD rispetto ai criceti trattati con la sola dieta HF. Durante questo periodo di trattamento, il DZ ha continuato ad esercitare un ruolo protettivo sullo stato emotivo dei criceti HFD come rilevato dal consistente aumento di permanenza (+64%) negli *open arms* rispetto al solo gruppo HFD (Fig.IV.13A).

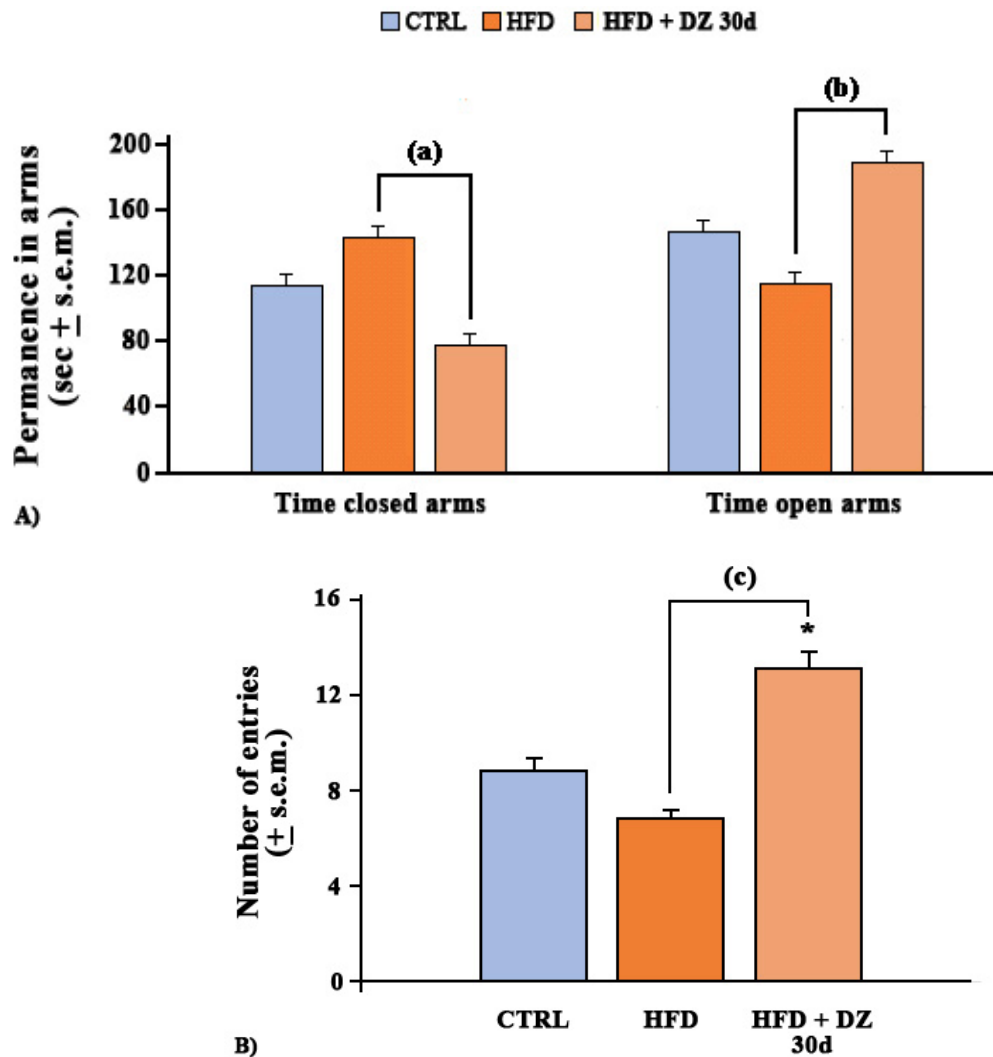
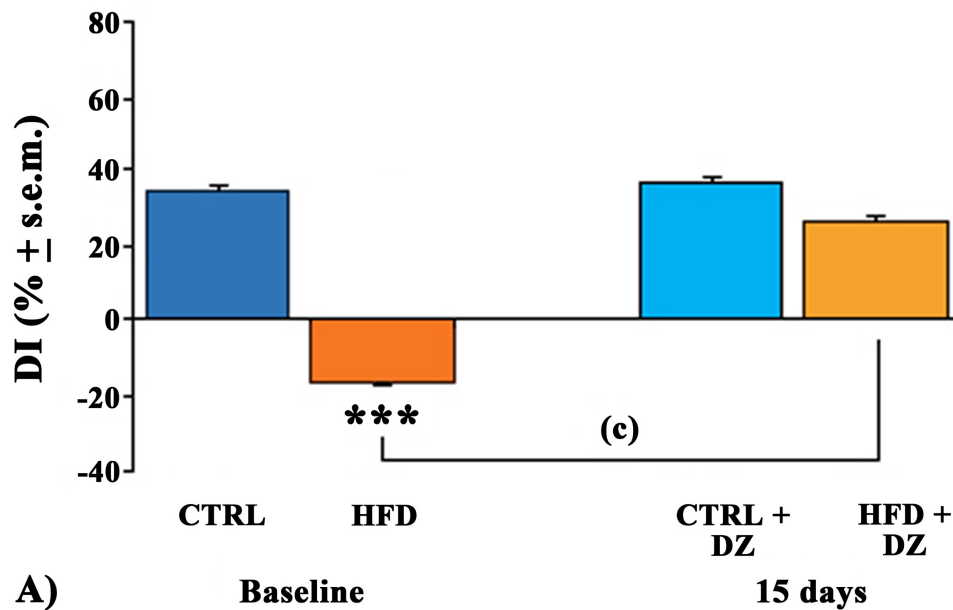


Fig.IV.13 Effetti del DZ in criceti HFD sul (A) tempo di permanenza (sec  $\pm$  s.e.m.) in *open* e *closed arms* oltre al (B) numero di entrate ( $\pm$  s.e.m.) nell'EPM dopo 15 giorni di trattamento. Il tempo medio trascorso nei due bracci dell'EPM rispetto alla durata totale del test (300 sec) e il valore medio di entrate totali degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), sono stati ottenuti mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 9. Per tale analisi, i rispettivi controlli del gruppo HFD e del gruppo HFD+DZ sono comparabili e quindi per evitare confusioni nelle diverse correlazioni è stato usato solo il valore medio relativo al CTRL + DZ; \*<sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ .

Tale effetto viene ulteriormente rafforzato dal moderato numero totale di entrate (+47%) nelle differenti braccia dell'EPM eseguito dai criceti HFD+DZ rispetto ai CTRL, che sorprendentemente risulta essere estremamente pronunciato quando viene confrontato con i criceti HFD (+ 91%; Fig.13B).

### IV.3 Effetti del DZ sulle alterazioni cognitive indotte dalla HFD

Per quanto concerne l'abilità cognitiva dei criceti esposti ai suddetti trattamenti è stato possibile osservare un ruolo protettivo dell'isoflavone sulle *performances* mnemoniche mediante NOR test. Anche in questo studio, l'azione benefica del DZ è stata registrata, sorprendentemente già dopo 15 giorni di trattamento, come evidenziato dal maggior tempo di esplorazione e da una migliore abilità di ricognizione verso l'oggetto nuovo da parte del gruppo HFD rispetto al gruppo (*baseline*) esposto solo alla dieta iperlipidica. Tali indicazioni sono state rappresentate dal consistente incremento del DI ( $p < 0.001$ ), un indicatore specifico delle *performance* cognitive, nei criceti HFD + DZ rispetto al gruppo HFD (Fig.IV.14A). Questo fenomeno è stato mantenuto anche dopo i 30 giorni di somministrazione del fitoestrogeno in cui i criceti hanno mostrato una maggiore predisposizione alla novità rispetto all'oggetto familiare, incrementando notevolmente il loro DI ( $p < 0.001$ ) rispetto ai criceti HFD (Fig.14B).



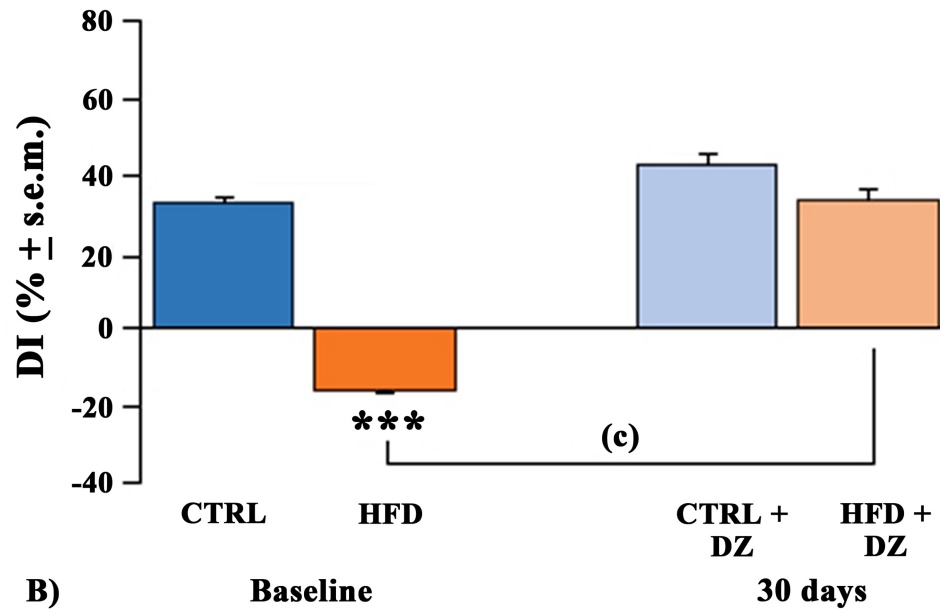


Fig.IV.14 Effetto del DZ sul NOR test in criceti HFD. Il DI (% ± s.e.m.) viene calcolato come differenza tra il tempo di esplorazione del nuovo oggetto e l'oggetto familiare rispetto al tempo totale di esplorazione di entrambi gli oggetti nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere) dopo 15 (A) e 30 giorni (B) di trattamento. La significatività riscontrata è stata ottenuta mediante analisi statistiche come riportato in Fig. 9; \*\*\*<sup>c</sup>p<0.001.

#### IV.4 Analisi ematiche: effetto del DZ sul profilo lipidico e glicemico

Immediatamente dopo il prelievo dell'encefalo e del sangue sono state eseguite delle analisi ematiche che da una parte hanno consentito di rilevare un profilo lipoproteico aterogenico del mio modello sperimentale, esito tipico di tale roditore quando viene esposto per lungo tempo a diete iperlipidiche, e dall'altra hanno confermato l'azione protettiva del DZ riportando i valori ematici ai livelli dei CTRL. Nel primo caso analizzato, i TRIG che sono i principali componenti del tessuto adiposo rappresentano un importante parametro indicativo della presenza di un disordine metabolico. Questa alterazione è stata rilevata nei nostri criceti HFD, dopo 12 settimane di dieta, in cui un notevole incremento ematico (+197%) dei TRIG rispetto ai CTRL è stato registrato (Fig.IV.15). Anche in questo caso, un effetto protettivo è stato esercitato dal fitoestrogeno mediante una moderata riduzione (-47%) dei livelli lipidici già a 15 giorni e che è diventata più consistente (-61%) a 30 giorni di trattamento rispetto ai criceti HFD.

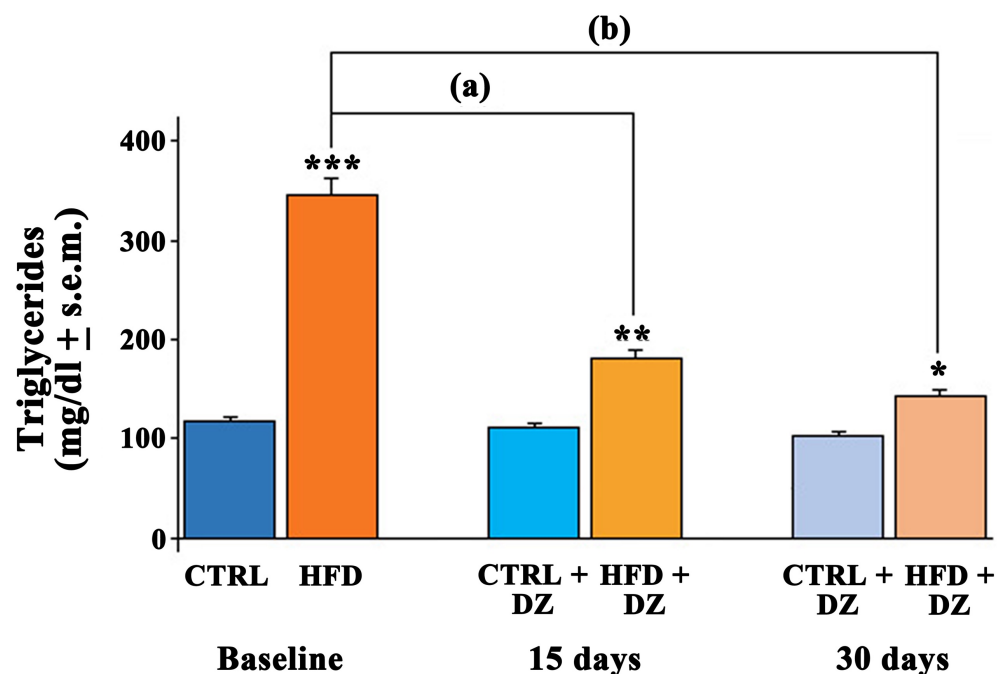


Fig.IV.15 Effetto del DZ sul profilo lipidico di criceti HFD. I livelli dei trigliceridi plasmatici (mg/dl  $\pm$  s.e.m.), degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche riportate in Fig. 9; \*<sup>a</sup>p<0.05; \*\*<sup>b</sup>p<0.01; \*\*\*p<0.001.

È stato ampiamente dimostrato che l'eccesso dei TRIG potrebbe causare anche un incremento del deposito di colesterolo. Difatti, nei criceti HFD, oltre ad uno stato di ipertrigliceridemia è stata riscontrata una consistente presenza di ipercolesterolemia come riportato dall'aumento (+76%) di tale sostanza lipoidea nel siero rispetto al gruppo sperimentale dei CTRL (Fig.IV.16). In linea con i risultati ottenuti per i TRIG, l'aggiunta del DZ nella dieta ha favorito un effetto benefico sia a 15 che a 30 giorni come riportato dal moderato abbassamento (-35%; -43%) del colesterolo ematico nei criceti HFD rispetto al gruppo esposto alla sola dieta iperlipidica.

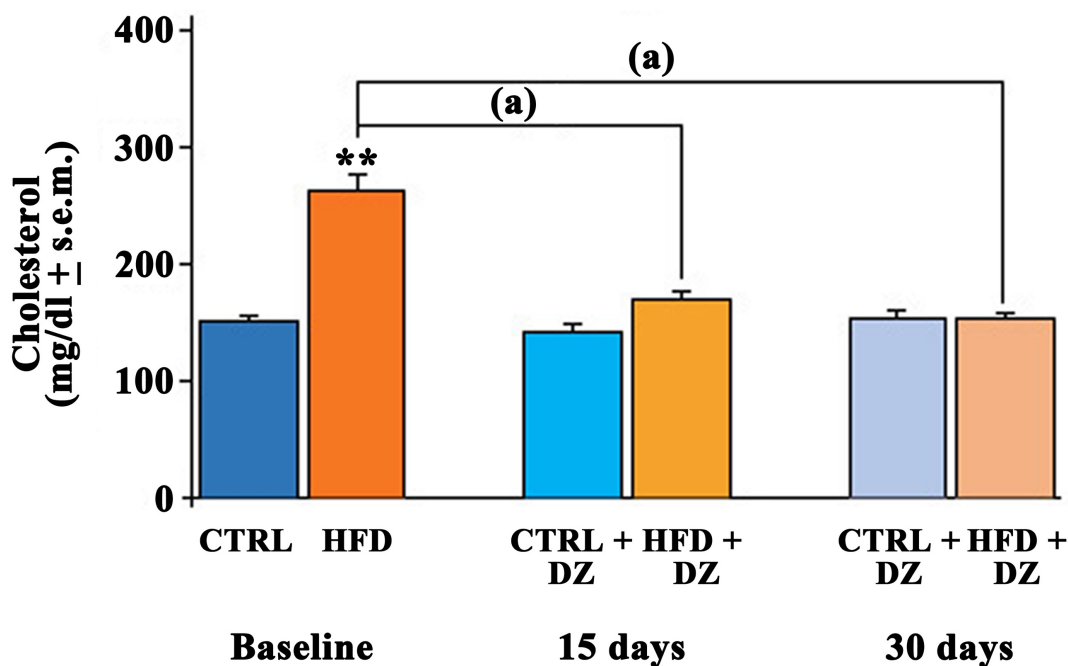


Fig.IV.16 Effetto del DZ sul profilo lipidico di criceti HFD. I livelli del colesterolo (mg/dl  $\pm$  s.e.m.), degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche riportate in Fig. 9; <sup>a</sup>p<0.05; \*\*p<0.01.

Accanto al profilo lipoproteico l'utilizzo di alimenti ricchi di grassi incide negativamente sull'indice glicemico anche se, a differenza delle diete ricche di carboidrati, ne determina un tardivo incremento prolungato nei criceti HFD. Analogamente nel nostro studio l'esposizione della dieta HFD, per 12 settimane di trattamento, induce solo un moderato incremento glicemico (+41%) rispetto ai criceti non trattati (CTRL; Fig.IV.17). Al contrario, negli animali iperlipidemici, gli isoflavoni ripristinano tale alterazione, come si osserva dal moderato decremento (-36%; -49%) del glucosio nel corso dell'intero trattamento con il DZ rispetto al gruppo HFD (*baseline*).

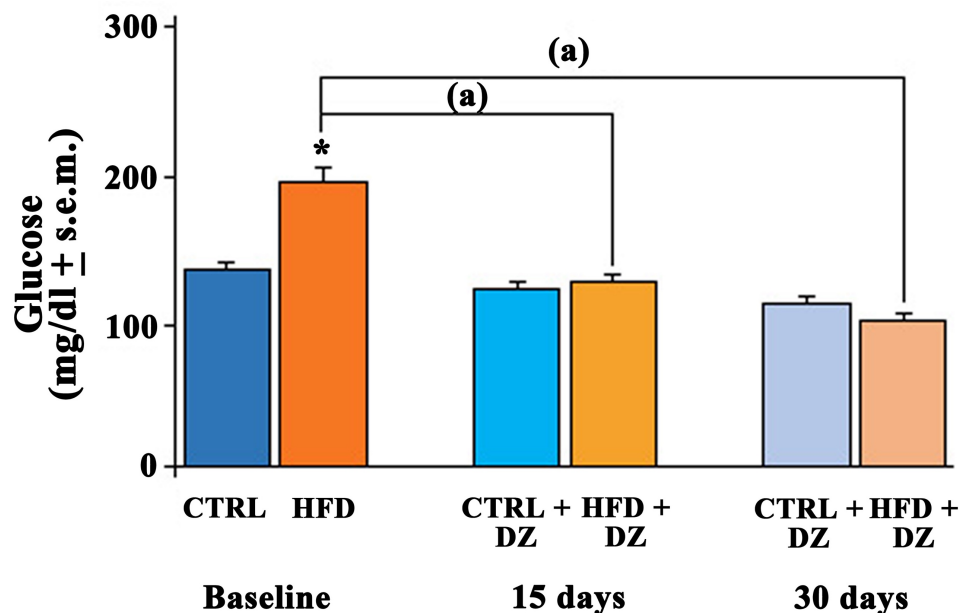


Fig.IV.17 Effetto del DZ sul profilo glicemico di criceti HFD. I livelli di glucosio (mg/dl  $\pm$  s.e.m.), degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche riportate in Fig. 9;  $*^a p < 0.05$ .

#### IV.4.1 Effetto del DZ sui parametri tissutali

Parallelamente al profilo biochimico-clinico dello stato metabolico è stato determinato lo stato morfologico (attraverso il peso tissutale) di quelle sedi che sono specificamente deputate alla trasformazione, all'accumulo e all'eliminazione degli elementi nutrizionali come il grasso addominale e il fegato. Per tale valutazione, il notevole incremento del grasso addominale (+380%), dopo 12 settimane di dieta HFD rispecchia l'alterato profilo lipidico dei criceti trattati. Questo andamento persiste anche durante il trattamento con il DZ a 15 giorni di trattamento, come si è potuto constatare dal notevole incremento di peso (+167%), anche se numericamente più basso, nei criceti HFD rispetto al suo CTRL (Fig.IV.18), mentre tale incremento è risultato essere soltanto moderatamente inferiore (-42%) se confrontato con il solo gruppo HFD.

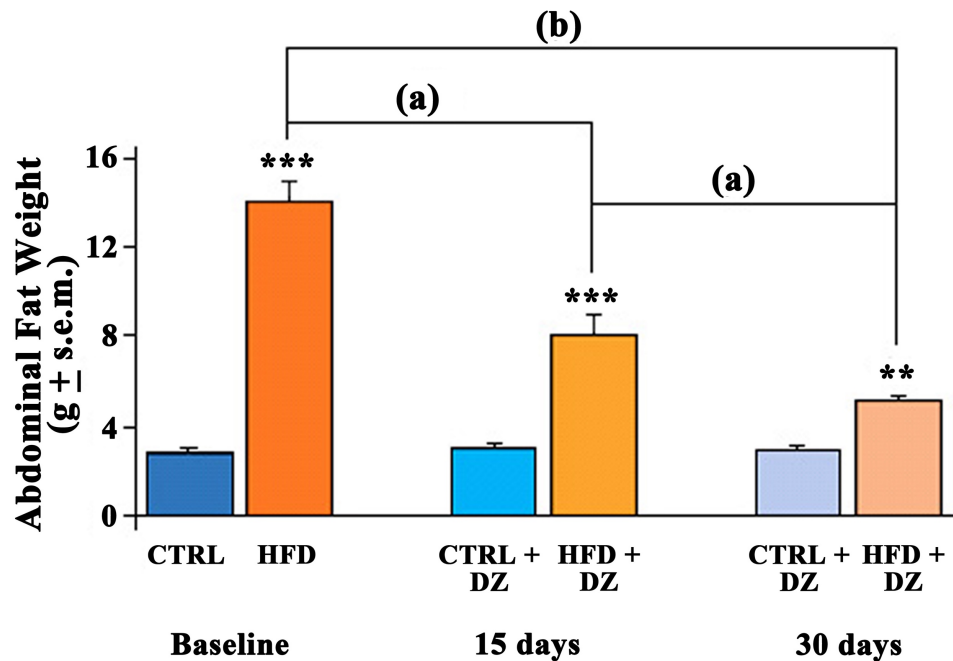


Fig.IV.18 Effetti di DZ sulla distribuzione del grasso addominale di criceti HFD. I valori medi del peso ( $g \pm s.e.m.$ ), degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche riportate in Fig. 9; <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ .

Per quanto concerne il periodo di 30 giorni di trattamento il peso tessutale ha continuato ad essere consistentemente (-64%) e moderatamente (-38%) diminuito quando comparato con i criceti HFD e HFD+DZ (15 giorni), rispettivamente. Nella stessa misura anche il peso del fegato ha mostrato un andamento simile, come si è potuto notare dal consistente incremento di tale peso nei criceti HFD (+60%) rispetto al CTRL (Fig.IV.19) confermando la presenza di un grave disordine metabolico. Tuttavia, il DZ sembrerebbe non influire sul peso del fegato dei criceti HFD, come evidenziato dalla lieve ma non significativa riduzione, sia a 15 che a 30 giorni di trattamento rispetto al gruppo HFD (*baseline*).



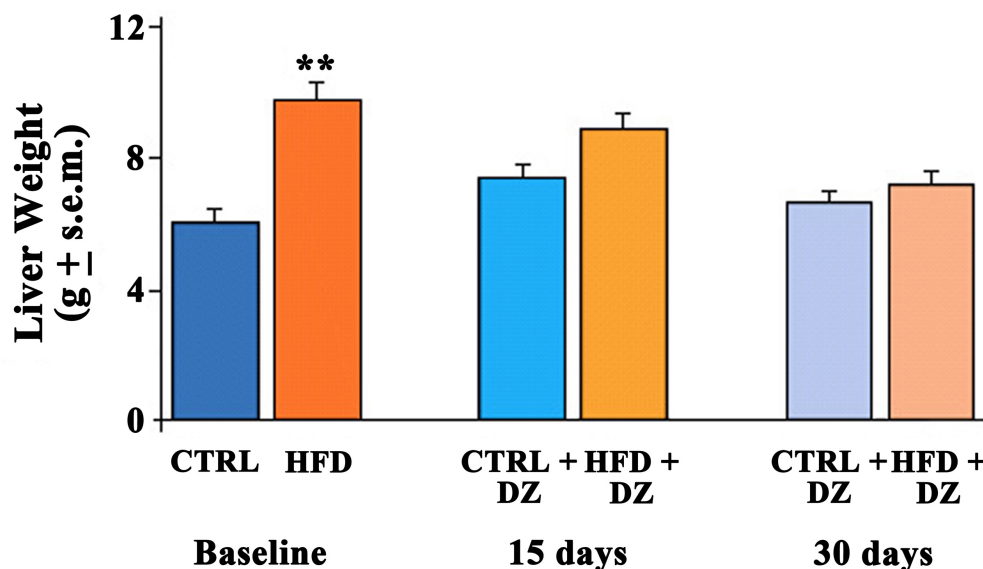


Fig.IV.19 Effetti di una dieta HF sul peso del fegato. I dati relativi ai valori medi ottenuti per il peso epatico ( $g \pm s.e.m.$ ), degli HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9;  $**p < 0.01$ .

#### IV.5 Effetti neurodegenerativi dell'HFD e neuroprotettivi del DZ

Al fine di valutare se il fenomeno neurodegenerativo nelle diverse aree encefaliche di *Mesocricetus auratus* fosse alla base delle variazioni riscontrate nell'analisi comportamentale è stata eseguita la colorazione istologica ACS che consente di individuare la presenza di campi neuronali degenerati sfruttando la reazione argirofilica. Dalle analisi qualitative è stato possibile stabilire, sulla base dell'addensamento dei granuli nei diversi campi neuronali, che animali trattati con una dieta HF per 12 settimane mostravano numerosi campi danneggiati dell'HTH (Fig.IV.20A) rispetto ai CTRL (Fig.IV.20B), mentre il trattamento con il DZ alla dieta HF, per 30 giorni (periodo responsabile dei maggiori effetti protettivi sulle alterazioni comportamentali), ha causato una vistosa diminuzione dei granuli ACS comparabile a quelli dei CTRL (Fig.IV.20C).

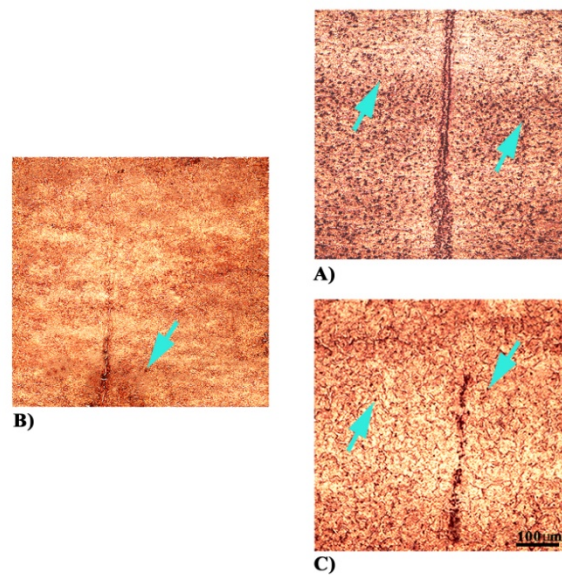


Fig.IV.20 Effetti di DZ sulla neurodegenerazione dell'HTH in criceti HFD. La distribuzione dei granuli, ottenuti mediante l'ACS, è risultata fortemente marcata in animali trattati con una dieta HF per 12 settimane (A) rispetto al CTRL (B) mentre negli animali HFD + DZ per 30 giorni (C) tale reazione argirofilica ha rilevato pochi campi neuronali danneggiati.

Tale andamento è stato osservato anche per le altre aree encefaliche come osservabile dal numero considerevole di neuroni degenerati riscontrati nell'HIP (Fig.IV.21) e nell'AMY (Fig.IV.22) le quali risultano entrambe coperte da densi livelli di granuli scuri. Similmente a quanto ottenuto per l'HTH, anche queste due aree hanno mostrato un forte recupero in seguito all'aggiunta del DZ alla dieta HF come osservato dai campi neuronali quasi privi di densi granuli tipici della reazione argirofilica.

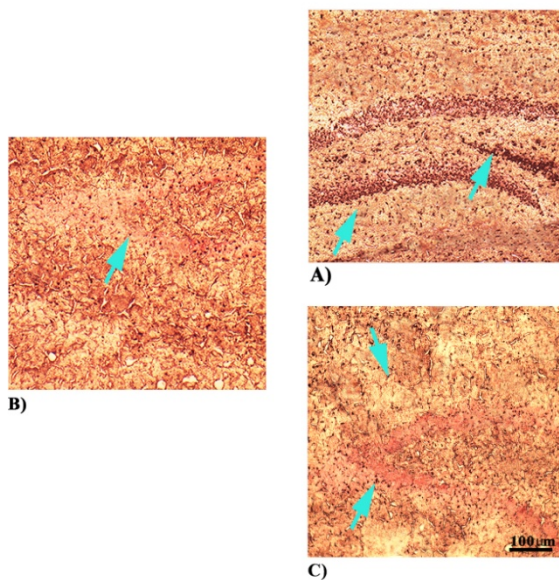


Fig.IV.21 Effetti di DZ sulla neurodegenerazione dell'HIP in criceti HFD. La distribuzione dei granuli, ottenuti mediante l'ACS, è risultata fortemente marcata in animali trattati con una dieta HF per 12 settimane (A) rispetto al CTRL (B) mentre negli animali HFD + DZ per 30 giorni (C) tale reazione argentofilica ha rilevato pochi campi neuronali danneggiati.

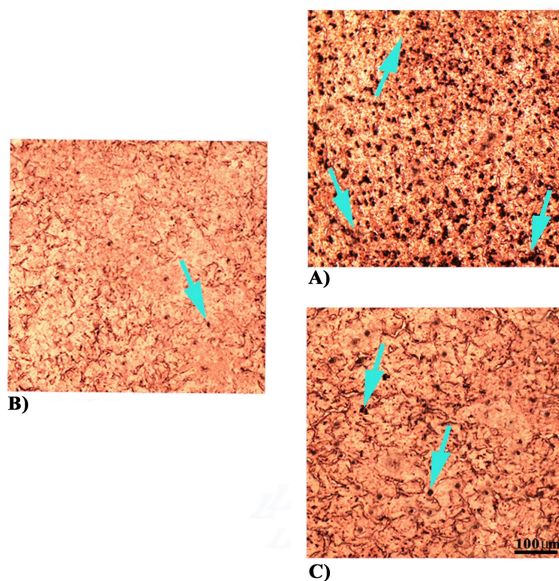


Fig.IV.22 Effetti di DZ sulla neurodegenerazione dell'AMY in criceti HFD. La distribuzione dei granuli, ottenuti mediante l'ACS, è risultata fortemente marcata in animali trattati con una dieta HF per 12 settimane (A) rispetto al CTRL (B) mentre negli animali HFD + DZ per 30 giorni (C) tale reazione argentofilica ha rilevato pochi campi neuronali danneggiati.

#### IV.6 Effetti della HFD sull'espressione di NTR1

Al fine di stabilire se il sistema NTergico è coinvolto nelle variazioni riscontrate durante le analisi comportamentali, è stata determinata l'espressione del recettore NTR1 maggiormente implicato negli effetti anoressigenici. Dai dati di *western blotting* è stata evidenziata una differenziata sintesi di tale recettore neuropeptidico già nell'HTH sia durante le osservazioni del NOR che del CPP in cui l'espressione del NTR1 risultava elevata (+135%) in criceti HFD rispetto al CTRL per il secondo test, mentre tale sito recettoriale dell'HTH non ha fornito alcuna implicazione sul NOR test (Fig.IV.23).

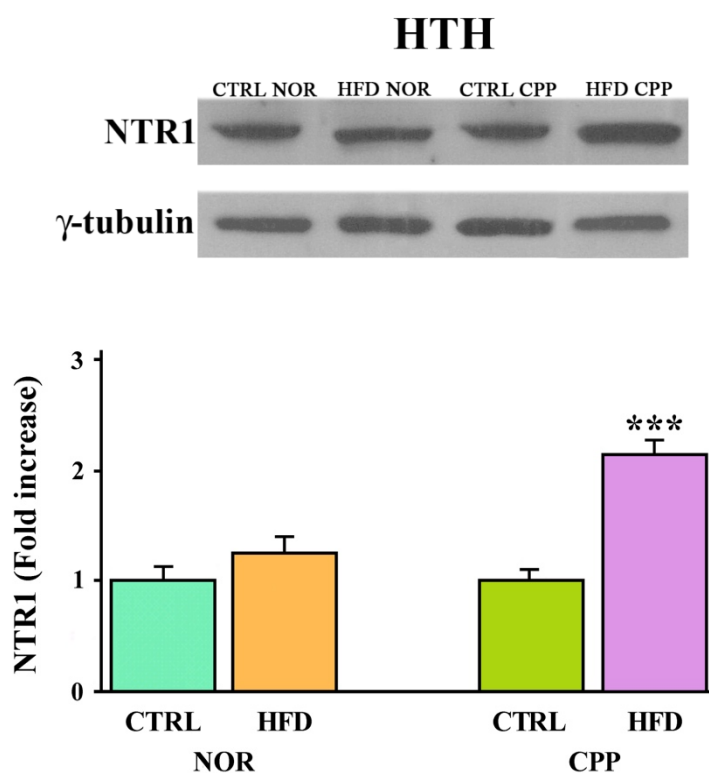


Fig.IV.23 Espressione di NTR1 (Fold increase) nell'HTH di criceti HFD. I dati relativi al *Western Blotting*, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD sono stati confrontati con quelli del CTRL mediante analisi statistiche indicate in Fig. 1; \*\*\* $p < 0.001$ .

Diversamente l'HIP dei criceti HFD ha rilevato una tendenza sostanzialmente inversa, dove una notevole densità del recettore (+101%) è stata riscontrata, questa volta, dopo il NOR test e solo un moderato livello di espressione (+50%) è stato registrato dopo le *performance* comportamentali del CPP rispetto al CTRL (Fig.IV.24).

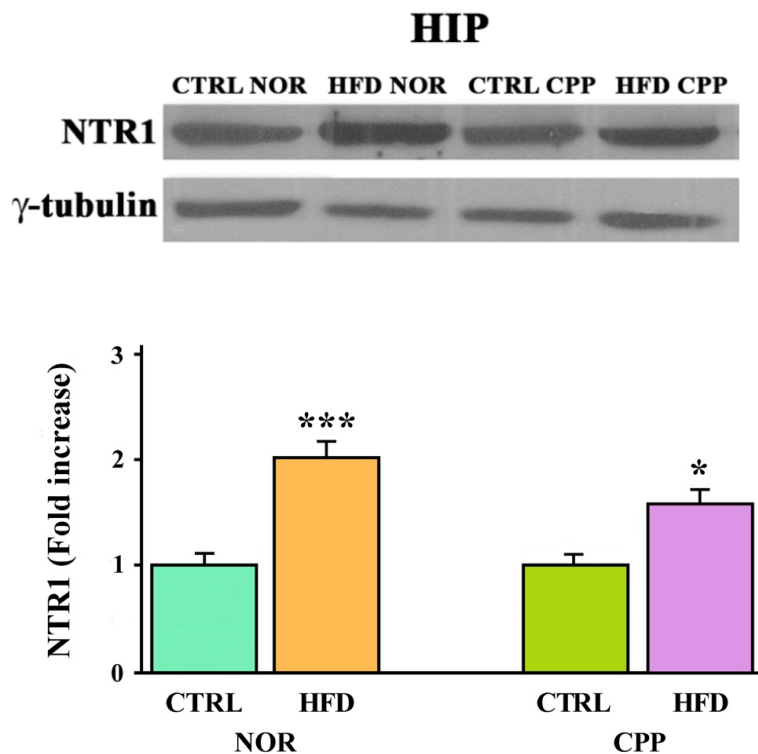


Fig.IV.24 Espressione di NTR1 (Fold increase) nell'HIP di criceti HFD. I dati relativi al *Western Blotting*, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD sono stati confrontati con quelli del CTRL mediante analisi statistiche indicate in Fig. 1; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Per quanto concerne l'AMY i livelli di espressione del NTR1 dei criceti HFD per questa struttura limbica sono risultati comparabili a quelli dell'HTH e precisamente notevoli livelli (+137%) di tale sito neuropeptidico hanno caratterizzato il CPP test mentre una moderata espressione (+46%) di tale recettore è stata rilevata dopo il NOR test rispetto al CTRL (Fig.IV.25).

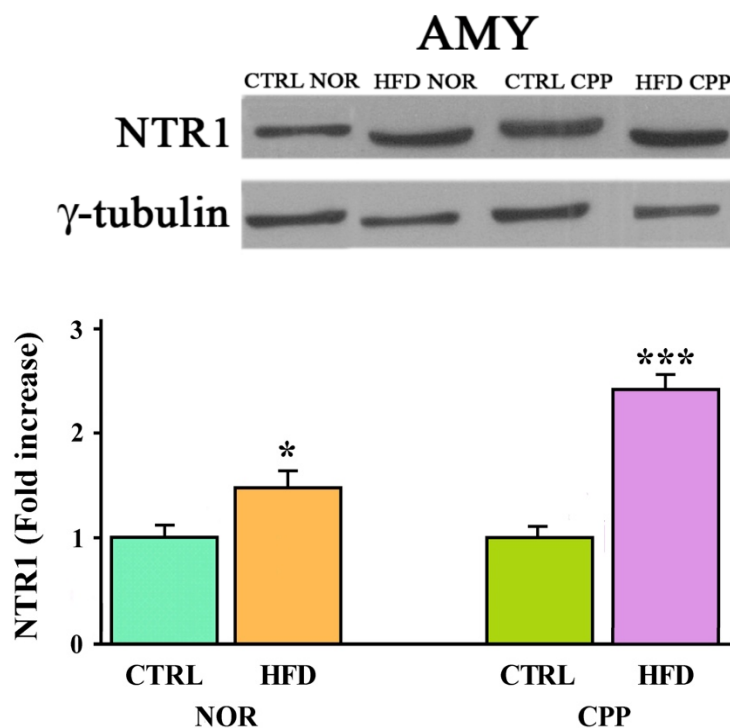


Fig.IV.25 Espressione di NTR1 (Fold increase) nell'AMY di criceti HFD. I dati relativi al *Western Blotting*, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD sono stati confrontati con quelli del CTRL mediante analisi statistiche indicate in Fig. 1; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

#### IV.7 Effetti del DZ sull'espressione di NTR1

A questo punto è risultato interessante correlare l'effetto del DZ sulla capacità di espressione del NTR1 nelle stesse aree limbiche dei criceti HFD sia a 15 giorni che a 30 giorni di trattamento ma in quest'occasione soltanto dopo il NOR test (specifico per la determinazione delle funzioni cognitive) allo scopo di valutare il ruolo protettivo di tale fitoestrogeno sulle abilità mnemoniche. Per quanto riguarda l'HTH di animali HFD, questa regione limbica ha mostrato una moderata riduzione dell'espressione di NTR1 sia a 15 (-31%) che a 30 (-51%) giorni di trattamento rispetto ai loro CTRL (Fig.IV.26). Tuttavia, il ruolo del fitoestrogeno tende ad emergere quando i livelli di questo sito neuropeptidico sono stati comparati con il gruppo HFD come si è evinto dal moderato decremento a 15 giorni (-32%) che è risultato essere ancora più consistente a 30 giorni (-63%).

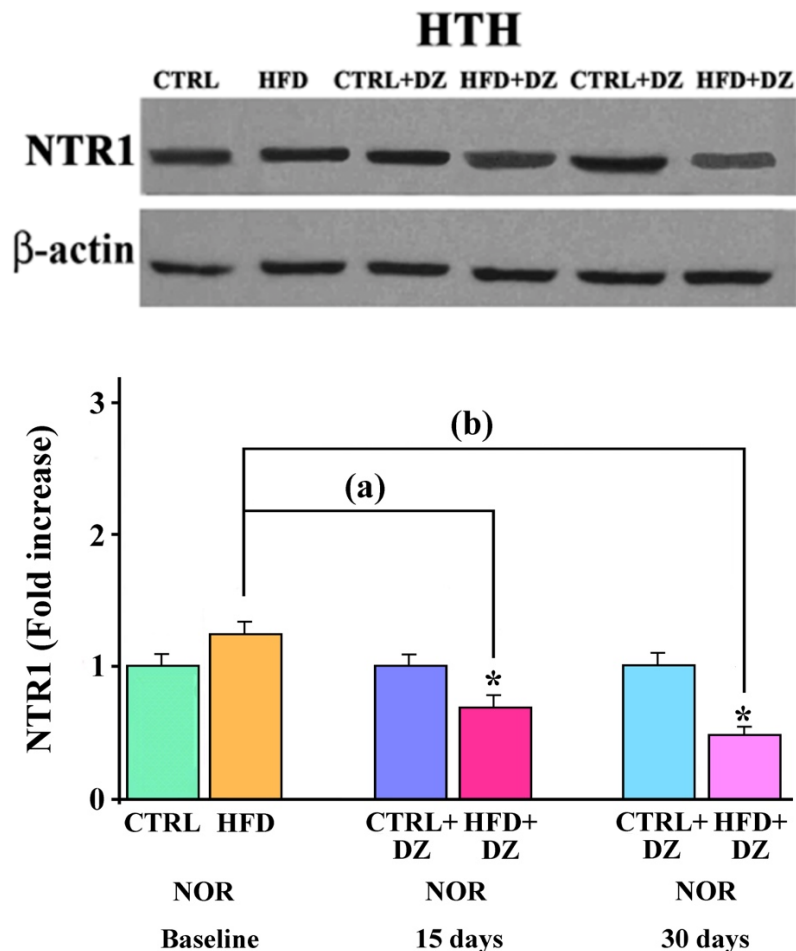


Fig.IV.26 Effetti del DZ sull'espressione di NTR1 (Fold increase) nell'HTH di criceti HFD esposti al NOR. I dati relativi al *Western Blotting*, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9; \*<sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01.

Sorprendentemente nell'HIP, tale fitoestrogeno ha, inizialmente, indotto una moderata riduzione dei livelli di NTR1 (-33%) a 15 giorni di trattamento (Fig.IV.27), e questa tendenza è risulta più consistente (-66%) a 30 giorni rispetto al CTRL. Anche in questo caso l'effetto dell'isoflavone ha assunto un ruolo sempre più dominante se confrontato con gli animali esposti alla sola dieta HF come dimostrato dai consistenti bassi livelli recettoriali (-64%) a 15 giorni per poi diventare notevolmente più basso (-82%) a 30 giorni.

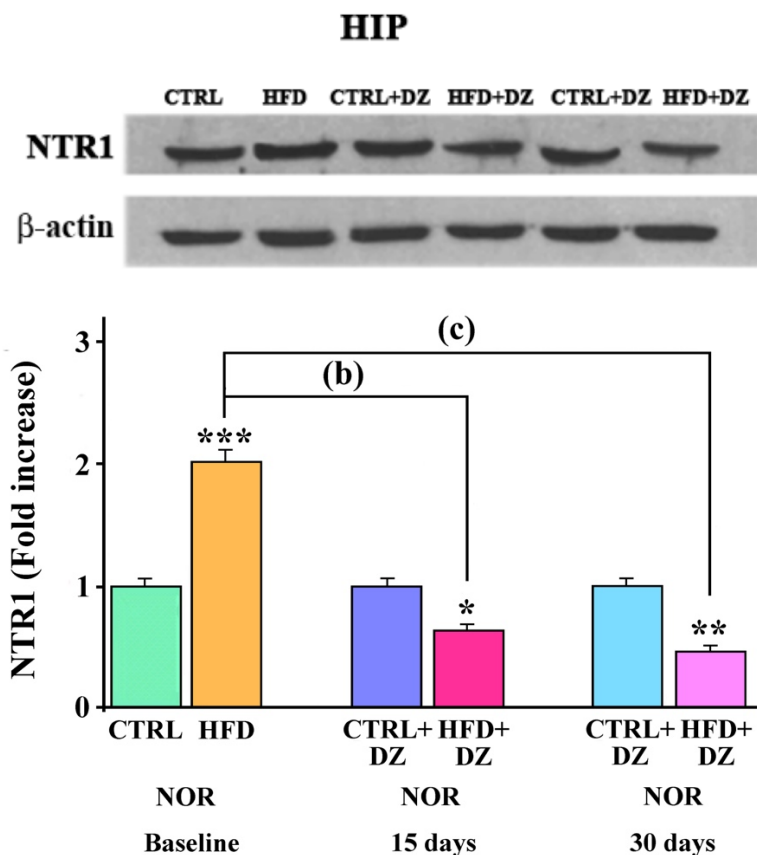


Fig.IV.27 Effetti del DZ sull'espressione di NTR1 (Fold increase) nell'HIP di criceti HFD esposti al NOR. I dati relativi al *Western Blotting*, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9; \* $p < 0.05$ ; \*\*<sup>b</sup>  $p < 0.01$ ; \*\*\*<sup>c</sup>  $p < 0.001$ .

L'AMY tende a conservare un andamento simile all'HTH come si è potuto notare, anche in questo caso, con una moderata riduzione recettoriale (-48%) dei criceti HFD solo a 30 giorni di esposizione al DZ rispetto al CTRL (Fig.IV.28). Diversamente, tale condizione è risultata maggiormente modificata quando gli effetti del fitoestrogeno sono stati comparati con gli animali HFD ed in modo specifico i livelli di NTR1 sono diminuiti moderatamente (-42%) e consistentemente (-64%) a 15 giorni e 30 giorni di trattamento.



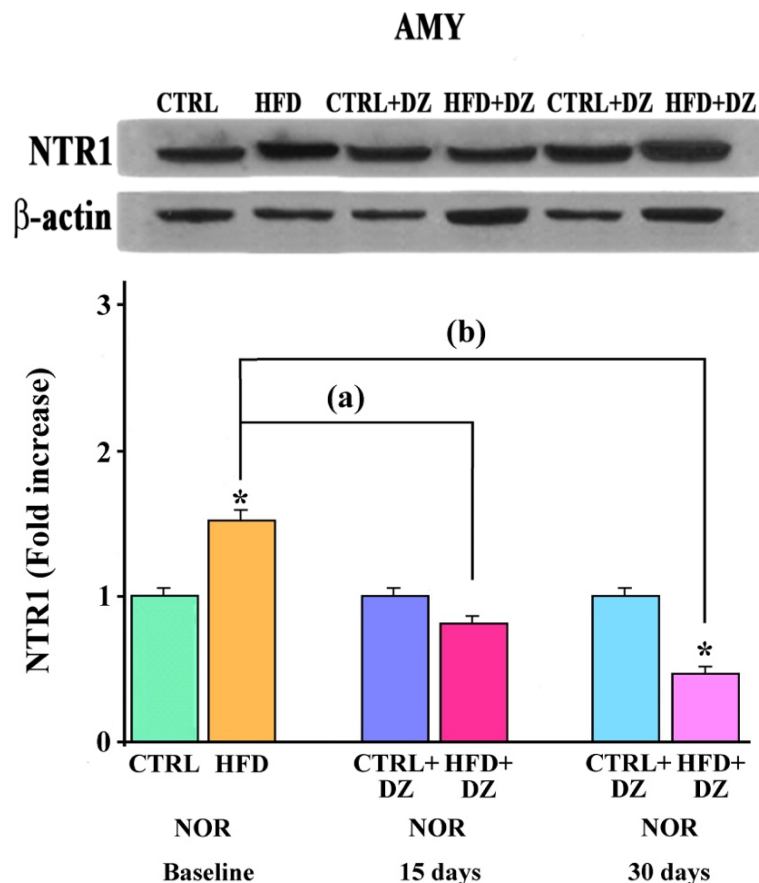


Fig.IV.28 Effetti del DZ sull'espressione di NTR1 (Fold increase) nell'AMY di criceti HFD esposti al NOR. I dati relativi al *Western Blotting*, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9; \*<sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> $p < 0.01$ .

#### IV.8 Effetti del DZ sull'espressione di IL-10

Le indicazioni relative agli eventi neurodegenerativi, tenderebbero a suggerire che le preponderanti azioni infiammatorie caratterizzanti i disordini metabolici, sono verosimilmente mediate dal rilascio di fattori anti-infiammatori come IL-10. Nel caso dell'espressione del fattore anti-infiammatorio nell'HTH di criceti HFD è risultata inattiva rispetto al CTRL dopo il NOR test (Fig.IV.29). Al contrario, l'esposizione con l'isoflavone ha indotto, sorprendentemente, un notevole incremento di tale citochina rispettivamente a 15 giorni e 30 giorni di trattamento, in seguito al confronto sia con i loro CTRL (+65%; +125%) che con il gruppo HFD (+95%; +209%).

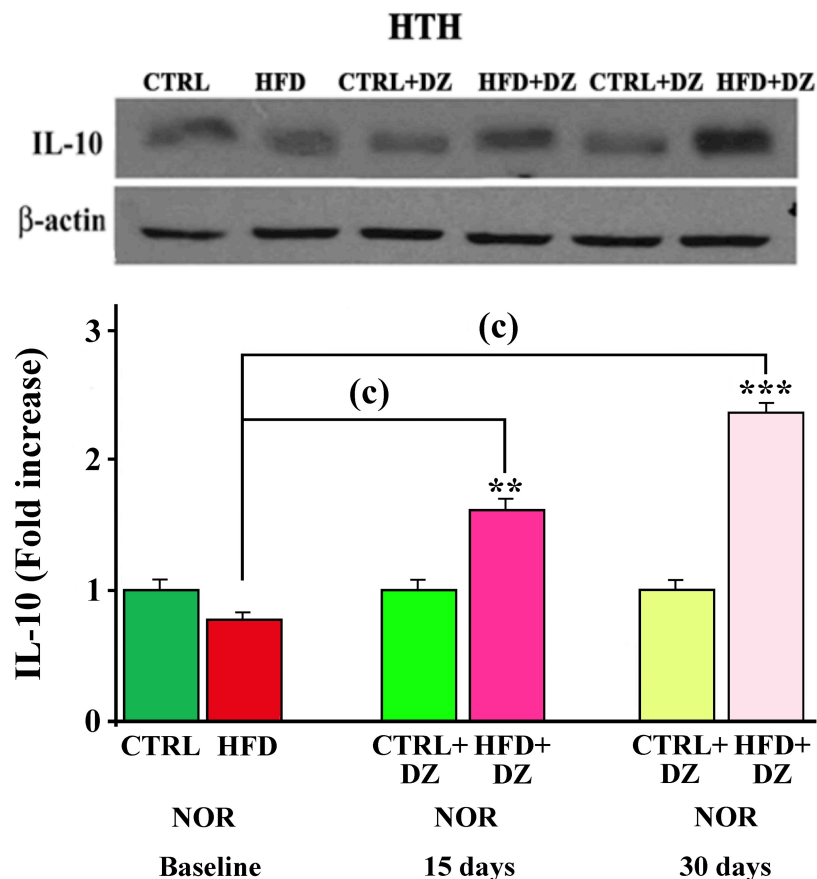


Fig.IV.29 Effetti del DZ sull'espressione di IL-10 (Fold increase) nell'HTH di criceti HFD. I dati relativi al Western Blotting, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto a CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9; \*\* $p < 0.01$ ; <sup>c</sup>\*\*\* $p < 0.001$ .

Diversamente, i livelli dell'IL-10 nell'HIP di criceti HFD sono risultati moderatamente ridotti rispetto al CTRL dopo il NOR test (Fig.IV.30). Tale tendenza è stata, invece, invertita dopo l'esposizione con DZ come si è potuto notare dal moderato incremento (+40%) dell'IL-10 a 15 giorni di trattamento, condizione che risulta, ulteriormente più pronunciata (+91%) a 30 giorni rispetto ai loro CTRL. In linea con questo tipo di effetto, l'espressione di tale citochina è risultata notevolmente incrementata (+209%; +295%) per entrambi i periodi di trattamento quando il ruolo del DZ è stato correlato ai soli criceti esposti alla dieta iperlipidica.

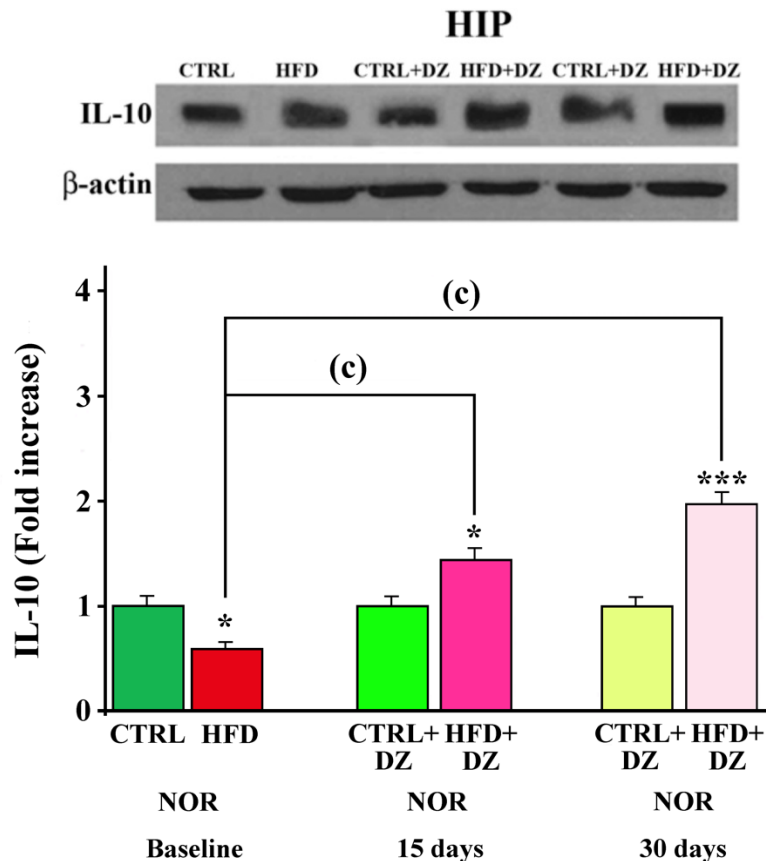


Fig.IV.30 Effetti del DZ sull'espressione di IL-10 (Fold increase) nell'HIP di criceti HFD. I dati relativi al Western Blotting, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9; \* $p < 0.05$ ; <sup>c</sup>\*\*\* $p < 0.001$ .

Per quanto concerne l'AMY, le espressioni riscontrate per l'IL-10 sono risultate evidenti solo a 30 giorni di trattamento con l'isoflavone come si è potuto osservare dal moderato aumento (+42%) rispetto al CTRL, valore che è risultato estremamente incrementato (+91%) quando confrontato con i soli criceti HFD (Fig.IV.31).

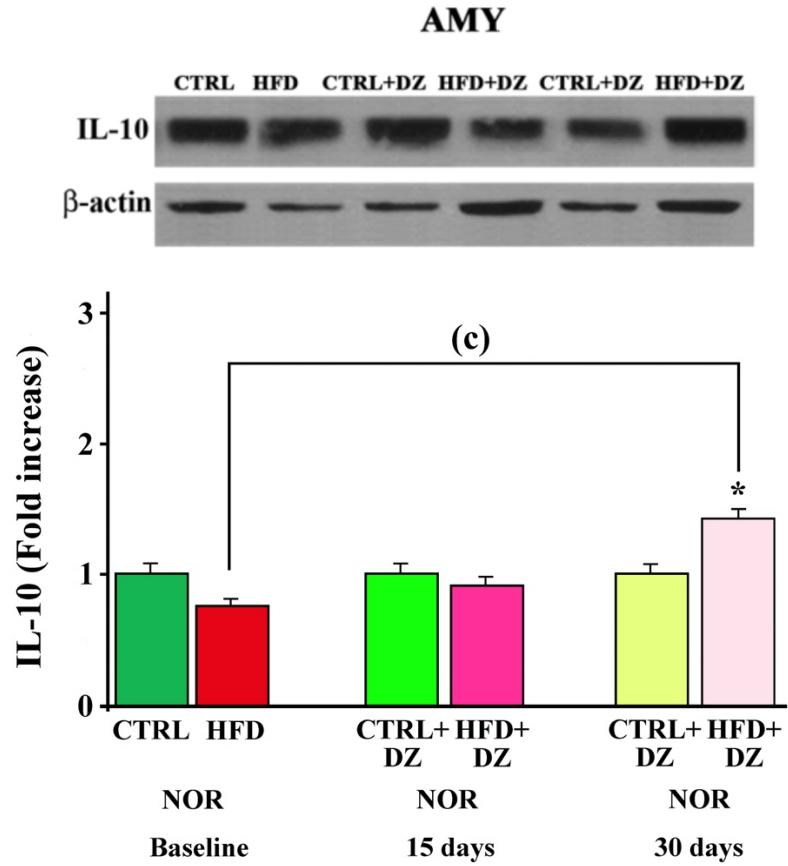


Fig.IV.31 Effetti del DZ sull'espressione di IL-10 (Fold increase) nell'AMY di criceti HFD. I dati relativi al Western Blotting, riportati come valori O.D. (optical density) nei criceti HFD in presenza o assenza di DZ rispetto al CTRL (\*) e rispetto al gruppo esposto alla sola HFD (lettere), dopo rispettivamente 15 e 30 giorni di trattamento, sono stati ottenuti mediante analisi statistiche indicate in Fig. 9; \* $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> $p < 0.001$ .

# DISCUSSIONE

Nel presente lavoro i risultati ottenuti forniscono le prime indicazioni sul ruolo protettivo che l'isoflavone DZ esercita sul nostro modello roditore ibernante (*Mesocricetus auratus*) iperlipidemico mettendo, al contempo, in evidenza nuove strategie molecolari encefaliche implicate, non solo nel mantenimento del bilancio energetico ma soprattutto nella regolazione dei disordini dell'ansia e sui meccanismi mnemonico-cognitivi. A tal riguardo, l'utilizzo di regimi dietetici sbilanciati nell'apporto dei nutrienti, negli ultimi anni, ha aiutato la ricerca a sviluppare e simulare fenotipi obesi, oltre a comprendere gli effetti che un disordine metabolico grave può avere sul comportamento alimentare e psico-fisico (Zhang et al., 2015; Ratner et al., 2016). Difatti, nei criceti dopo esposizione prolungata di una HFD sono stati riscontrati alterati comportamenti del *feeding* come evidenziato da una riduzione della *feeding duration* e del *food/H<sub>2</sub>O intake* oltre ad un incremento del *body weight*. Tali variazioni indotte dal *feeding behavior* sono in linea con quanto riportato da precedenti studi in cui l'assunzione di diete iperlipidiche riducono notevolmente l'ampiezza del ritmo quotidiano del comportamento alimentare attraverso diversi meccanismi ancora oggi poco chiari (Branecky et al., 2015). Si suppone che HFD induca un surplus di energia responsabile dell'obesità in cui l'aumento di peso corporeo non sia dovuto alla quantità di cibo assunta ma all'elevato contenuto energetico presente nella dieta. È stato, inoltre, mostrato come l'assunzione di energia negli animali HFD non sembri essere influenzata dall'aumento di ormoni ipotalamici implicati nel controllo del *feeding*, come la leptina, che sebbene sopprima la quantità di cibo, ha poco effetto sull'apporto calorico (Chakraborty et al., 2016).

Accanto a queste conseguenze morfologiche, indotte da HFD è emersa una correlazione negativa tra l'assunzione di diete iperlipidiche e l'attività locomotoria, in quanto i criceti hanno mostrato un ridotto livello di *rearing*, *grooming* ed *explorative behaviors* in accordo con gli effetti di topi esposti ad una dieta HF, nonostante tali deficit motori siano stati riscontrati a partire dal primo giorno di trattamento (Branecky et al., 2015). In questo caso i vari fattori periferici e del SNC come il sistema DAergico-mesolimbico, che controllano le azioni indotte da cattive abitudini alimentari (inclusi i difetti locomotori), sono alla base della carenza di regolari movimenti esploratori e del blocco di qualsiasi forma di locomozione (Bjursell et al., 2008; Kravitz et al., 2016). Tali attività, legate alla DA, hanno causato nette condizioni di obesità in topi knockdown (per questo neuromediatore), in seguito alla HFD, rispetto a topi *wild-type* con conseguenti ripercussioni sulle attività fisiche e nutrizionali (Beeler et al., 2016).

Conseguentemente lo stato emotivo di criceti HFD espresso durante l'EPM test, ha evidenziato una loro maggiore permanenza negli ambienti chiusi, indice di un comportamento ansioso

nonostante gli stessi abbiano esibito atteggiamenti esplorativi. Per tale osservazione, stati emotivi simili e depressivi sono da attribuire al consumo di una dieta iperenergetica che innalza non solo i livelli di corticosterone ematico, ma allo stesso tempo, promuove l'insorgenza di condizioni di insulino-resistenza periferica a causa di un alterato coinvolgimento del circuito ipofisario-ipotalamico-surrenale (HPA) con manifestazioni di stati d'ansia nonché tendenze anedoniche ed ipoattività (Pratchayasakul et al, 2011; Dutheil et al., 2016). Queste indicazioni sono, ulteriormente rafforzate dall'azione ansiogenica indotta da un'eccessiva assunzione di cibi a base di saccarosio che portano ad una maggiore condizione di stress, e quindi ad una ridotta reattività motoria (Rebolledo-Solleiro et al., 2017).

Sul piano prettamente mnesico, l'analisi delle *performance* cognitive nel NOR test, effettuato su criceti HFD ha rilevato un decremento significativo del DI come suggerito dalla loro ridotta capacità di esplorazione verso oggetti ed ambienti nuovi rispetto a quelli familiari. Questa tendenza è fortemente in accordo con ratti caratterizzati da un marcato disordine metabolico associato a stati depressivi, d'ansia e soprattutto accentuati deterioramenti cognitivi legati ad una ridotta attrazione verso oggetti nuovi (Gancheva and Zhelyazkova-Savova, 2016). In questo contesto, le incapacità cognitive sono correlate ad alterati processi neuronali come indicato da studi condotti su topi transgenici per malattie neurodegenerative, in cui l'esposizione ad una dieta iperlipidica tende ad accelerare tali difetti attraverso l'incremento dello stato ossidativo neuronale oltre ad elevati livelli di apoptosi soprattutto a carico dei centri HIP (Sah et al., 2017) che va nella stessa direzione di animali diabetici con lunghi periodi di ipoglicemia (McNeilly et al, 2016). Parallelamente, anche il CPP, coerentemente con il NOR, ha evidenziato una leggera riduzione del *preference score* nei criceti HFD, poiché le condizioni obesogeniche hanno influenzato la loro preferenza per il lato non associato al cibo, aspetto che denota una diminuita capacità cognitiva e mnemonica facendo supporre l'inabilità dell'animale di ricordare l'evento gratificante (Kanoski et al., 2011). Anche in questo caso lo stato iperlipidico interferisce sulle funzionalità HIP mediante una riduzione delle spine dendritiche dell'area CA1 che evoca alterati segnali *long-term potentiation* (LTP) in topi e di conseguenza una riduzione dei processi di consolidamento mnemonico (Johnson et al., 2015; Kim et al., 2015).

Per quanto concerne il ruolo del DZ sugli aspetti psico-fisici, i criceti HF trattati con tale fitoestrogeno hanno mostrato un forte ripristino delle prestazioni nutrizionali come si è potuto osservare dal ridotto *body weight*, soprattutto dopo 30 giorni, nonostante manifestino un comportamento edonico verso il cibo. Analogamente, topi trattati con DZ, per lo stesso intervallo

di tempo, hanno evidenziato un aumento dell'assunzione di cibo senza incrementare il loro peso corporeo (Lund et al., 2001), sottolineando come i frequenti intervalli locomotori inducono un maggiore consumo energetico che ha agito da effetto compensatorio. D'altronde, questo effetto può essere strettamente associato all'interazione del DZ (o dei suoi metaboliti) con i siti ER dell'HTH poiché la delezione specifica di questo sito ha attivato lo stimolo di *feeding*, una maggiore richiesta energetica e quindi un aumento del peso corporeo, condizione tipica di uno stato anabolico (Musatov et al., 2007; Zeng et al., 2010; Xu et al., 2015). La predominanza degli isoflavoni su tale effetto trova conferma con l'interferenza del sito ER $\alpha$  del VMN provocando una marcata sindrome metabolica con conseguente obesità, iperfagia, oltre ad una ridotta tolleranza al glucosio ed un basso dispendio energetico (Musatov et al., 2007).

In maniera simile agli effetti di DZ sul *feeding*, questo fitoestrogeno ha recuperato la scarsa abilità locomotoria dei criceti HFD durante l'intero periodo di trattamento, ma soprattutto a 30 giorni, che è risultato comparabile all'incrementata attività locomotoria spontanea all'interno della *novel cage* in topi trattati con lo stesso isoflavone (Zeng et al., 2010; Ahmed et al., 2017). Anche per questa attività vengono indicati i recettori ER $\alpha$  quali elementi chiave nell'esplicare gli effetti dell'isoflavone come suggerito dalla disfunzione genica di ER $\alpha$ , ma non di ER $\beta$ , maggiormente responsabile della notevole attività esplorativa nell'*open fields* (Chambers et al., 2007; Mosquera et al., 2014). Il trattamento con DZ ha ristabilito anche la reattività dell'animale nell'EPM già dopo 15 giorni di dieta nei criceti HFD i quali hanno trascorso meno tempo nei bracci chiusi oltre a manifestare un consistente incremento del numero di entrate totali in tutti i bracci dell'intero *maze*. Analogamente, tale fitoestrogeno somministrato agli animali HFD per un tempo più prolungato ha provocato una disinibizione come dimostrato da un incremento del periodo trascorso nei bracci aperti oltre che dal numero più elevato di intervalli di esplorazione. Anche in questo caso l'effetto di DZ sembra favorire l'induzione di uno stato ansiolitico che è in linea con l'interazione di questo fitoestrogeno con il sito ER $\beta$  (ansiolitico) più che il sito  $\alpha$ , come indicato da una prevalenza di stati ansiolitici e depressivi in topi correlati ad elevati livelli encefalici del sito  $\beta$  (Sharama and Thakur, 2015). Nel caso delle *performances* mnemoniche, i criceti HFD trattati con DZ hanno esibito una maggiore abilità di riconoscimento dell'oggetto nuovo, nel corso del NOR test, già da subito; la rapidità e l'efficienza con cui l'isoflavone ha invertito il declino cognitivo è in accordo con quanto rilevato sia nell'uomo che in diversi modelli di roditori (Kean et al., 2015; Matias et al., 2016). Diversi studi ipotizzano, infatti, che gli isoflavoni di soia possono migliorare la cognizione, attraverso la protezione contro lo stress ossidativo, aumentando i livelli di antiossidanti nel tessuto



cerebrale e nel sangue (Gleason et al., 2015), azioni che prevedono l'attivazione dei siti ER $\beta$ , il quale ritengo possa agire come sito chiave delle azioni neuroprotettive per il DZ favorendo una consistente capacità mnemonica, che è linea con l'inabilità del sito  $\alpha$  a promuovere attività di riconoscimento sociale (Bernal-Mondragón et al., 2017).

L'azione protettiva esercitata dal DZ sulle *performance* comportamentali e sul *body weight* è stata anche evidenziata su i profili lipidici e glicemici ematici. Difatti i livelli della glicemia, del colesterolo e dei TRIG, che risultavano fortemente alterati dalla dieta HF sono stati attenuati dal derivato dell'isoflavone di soia soprattutto dopo 30 giorni di trattamento in accordo con i ridotti livelli di colesterolo sia in ratti ovariectomizzati che in quelli intatti dopo lo stesso intervallo di esposizione al DZ (Bhattarai et al., 2017). Similmente, la somministrazione della genisteina, isoflavone appartenente alla stessa famiglia del DZ che esplica azioni agonistiche sui recettori ER, ha profondamente ridotto l'alterato profilo lipoproteico in topi HFD (Guo et al., 2009; Tang et al., 2015). Per quanto concerne l'azione ipoglicemizzante esercitata dal derivato della soia (usato nel mio lavoro) sembrerebbe che tale riduzione sia legata all'abbassamento degli stati ossidativi glucosio-dipendenti, condizione correlata alla soppressione dei fattori antiinfiammatori come ossido nitrico sintetasi inducibile, cicloossigenasi-2 e NF- $\kappa$ B (Park et al., 2016).

Al fine di correlare le alterazioni fisico-comportamentali a danni neuronali, indotti dalla dieta HF nelle suddette aree limbiche (HTH, HIP ed AMY), l'analisi ACS ha rilevato un notevole accumulo di granuli (indice di morte cellulare) mediante la determinazione della reazione argentofilica, che coincide con i processi neurodegenerativi. Effetti che sono stati prontamente invertiti dopo 30 giorni di trattamento con DZ. In questo caso le alterazioni riportate ai diversi livelli encefalici risultano essere legati alle azioni obesogeniche-dipendenti che consistono nell'insorgenza di uno stato di insulino-resistenza accompagnata da diminuiti livelli della proteina chinasi B oltre alla calpain1 ed all'eme ossigenasi-1 (Kang et al., 2015; Karelina et al., 2016). Le azioni protettive (Occhiuto et al., 2008) espresse dall'isoflavone sono in accordo con quanto indicato da recenti evidenze in cui effetti neurotossici cerebrali sono stati arrestati in seguito al ripristino di fattori di pro-neurogenesi come BEX2 e tirosina idrossilasi (Li et al., 2017) oltre alla riduzione dei fattori pro-infiammatori quali ROS e p38 MAPK fosforilata (Chinta et al., 2013). Questi risultati enfatizzano il ruolo protettivo del DZ sul sistema immunitario durante i disordini metabolici. È ormai noto come l'eccesso di tessuto adiposo degli obesi sia fortemente associato agli eventi molecolari pro-infiammatori e pertanto il rilascio di citochine potrebbe costituire un elemento chiave implicato nella diffusa disfunzione sinaptica responsabile della morte cellulare.

Tuttavia, nel mio studio il DZ, in condizioni iperlipidiche, determina un effetto opposto come è emerso dal notevole incremento della citochina anti-infiammatoria (IL-10) a livello delle aree limbiche analizzate, rispetto ai bassi livelli registrati nei criceti HFD. In accordo con il ruolo benefico dell'IL-10, studi *in vitro* su co-culture adipociti-macrofagi trattate con questo citochina hanno dimostrato un suo effetto anti-obesità ed anti-infiammatorio (Toita et al., 2016) probabilmente attraverso la inibizione della Jun N-terminal chinasi (JUNK) fosforilata portando, di conseguenza, alla riduzione dei macrofagi del tessuto adiposo, tipica dell'insulino-resistenza (Sakamoto et al., 2016). L'integrazione di isoflavoni di soia contenente prevalentemente DZ e daidzin (glucoside del DZ) ha, inoltre, determinato profili di espressione genica antinfiammatoria nei tessuti adiposi delle donne in post-menopausa (Setchell et al., 2003; van der Velpen et al., 2014), che rafforzerebbe ulteriormente la favorevole strategia terapeutica dell'IL-10 indotta dal DZ.

Parallelamente l'elevata espressione trascrizionale del NTR1 nei criceti HFD è stata fortemente ridotta dall'isoflavone in maniera area specifica. In particolare, incrementati livelli di tale recettore sono stati riscontrati nell'HTH e nell'AMY dopo il CPP test e nell'HIP dopo il NOR test. Quest'ultima relazione viene corroborata dai risultati di recenti studi che hanno evidenziato un ruolo inibitorio da parte di diete HF sull'esecuzione della memoria episodica e spaziale a causa dell'alterata organizzazione neuronale (Sarfert et al., 2017) e dell'*up-regulation* del NTR1 (Vadnie et al., 2014; Li et al., 2016) in seguito alle condizioni infiammatorie dell'HIP. Il recupero dei deficit mnemonici è da attribuire all'elevata disponibilità di siti ER $\beta$  che legandosi con DZ riducono l'espressione di NTR1 e favoriscono, a loro volta, l'incremento di processi di neurogenesi a livello dell'HIP con conseguente ripristino cognitivo (Bastos et al., 2015; Yamada et al., 2016; Bernal-Mondragón et al., 2017). In tale contesto, l'affinità strutturale dell'isoflavone con gli estrogeni rafforza la partecipazione dei ER $\alpha/\beta$  sull'espressione dei NTR1, attraverso l'attivazione dell'AMPK (Cheong et al., 2014), in maniera analoga agli effetti della genisteina su tale recettore periferico (Prasad et al., 2004). Pertanto, non dovrebbe sorprenderci che la somministrazione di diete a base di DZ o genisteina, costituiscono applicazioni terapeutiche per migliorare l'attività cognitiva e motoria anche in modelli roditori per AD (Kobilo et al., 2014; Peña-Altamira et al., 2017) attraverso la riduzione trascrizionale del NTR1 (Xiao et al., 2014).

Contestualmente gli elevati livelli di NTR1 nell'HTH e nell'AMY dopo il CPP sono in linea con una ridotta motivazione dei criceti nell'eseguire qualsiasi forma di attività motoria a causa delle loro condizioni iperlipidiche. Questo aspetto è in accordo con gli effetti indotti da HFD in

topi KO per NT, i quali assorbono meno acidi grassi alimentari, essendo protetti dall'obesità, dalla resistenza all'insulina (Kim and Mizuno, 2008; Leininger et., 2011; Levitas-Djerbi et al., 2015) e soprattutto esibiscono una accentuata attività locomotoria (Vadnie et al., 2014). È interessante notare che diverse ipotesi sono state avanzate in merito ed in particolare sembrerebbe che fibre NTR1 contenenti LepRb siano sovrapposte con siti GABA<sub>A</sub>ergici contenenti anche essi LepRb. Quando i livelli di NTR1 sono elevati viene indotta una soppressione di *feeding* e controllo energetico probabilmente attraverso l'attivazione dei siti GABAergici-LepRb che bloccano la via ORXergica a livello HTH (Goforth et al., 2014; Brown et al., 2017). A tale riguardo numerose evidenze hanno suggerito come la somministrazione intracerebrale o intraperitoneale di NT induca la soppressione acuta dell'assunzione di cibo nei ratti in accordo con quanto osservato nei nostri modelli sperimentali (Boules et al., 2000; Cooke et al., 2009; Li et al., 2016). Diversamente, l'interazione del solo NTR1 favorisce gli effetti obesogenici quali assorbimento del grasso intestinale e steatosi epatica con conseguente incremento del peso corporeo (Dijkman and Watt, 2015; Woodsworth et al., 2017) mediante la riduzione di AMPK ed ERK, enzimi intracellulari rilevanti per l'omeostasi metabolica oltre all'attività locomotoria (Li et al., 2016; Voyer et al., 2017). Pertanto, non solo le persone obese e insulino-resistenti hanno maggiori probabilità di avere livelli elevati dell'ormone precursore (Pro-NT), nel loro sangue ma anche gli individui non obesi hanno mostrato il doppio della probabilità di sviluppare obesità rispetto alle persone con livelli più bassi (Li et al., 2016).

In conclusione, questi primi dati evidenziano il recupero da parte del DZ sulle alterazioni neurocomportamentali indotte da una HFD e soprattutto il suo effetto neuroprotettivo sull'infiammazione e sulla neurodegenerazione che caratterizzano i disordini metabolici dei criceti. A livello comportamentale tale fitoestrogeno ha ripristinato le condizioni corporee dell'animale HFD oltre alle alterate attività locomotorie associate ad un comportamento ansioso come suggerito dalle indagini condotte nell'EPM. Nel contempo, anche le capacità mnemoniche osservate nel NOR sono state fortemente recuperate in accordo con l'utilizzo di diete a base degli isoflavoni che fortemente riducono gli episodi di *anxiety-like behaviors* e di conseguenza migliorano l'esplorazione verso ambienti ed oggetti nuovi (Khodamoradi et al., 2017; Lee et al., 2017). Dalle differenziate attività trascrizionali dell'IL-10 e del NTR1 è emersa la possibilità che più di un *pathway*, in maniera estrogeno dipendente, modula sia gli effetti della HFD che l'azione di recupero DZ in aree cerebrali specifiche nel controllo di prestazioni mnemoniche oltre agli stimoli

dell'appetito (Fujitani et al., 2015; Loutchanwoot et al., 2015; Arlt et al., 2017). Pertanto, questi primi risultati propongono nuovi meccanismi molecolari in grado di innescare risposte neuroprotettive e adattive con eventuali applicazioni terapeutiche alternative per la cura dell'obesità. Tale aspetto è in via di indagine anche in studi *in vitro* dove l'azione neuroprotettiva del DZ sarà valutata su colture HTH di 7-9 giorni sottoposte a trattamenti con acido palmitico (agente responsabile di neuroinfiammazione) al fine di fornire indicazioni utili sulla capacità dell'isoflavone di recuperare la vitalità e la differenziazione neuronale compromesse in maniera comparabile alle condizioni di obesità.

# BIBLIOGRAFIA

- Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschöp MH, Gao XB, Horvath TL (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* 116(12): 3229-3239.
- Abreu AR, De Abreu AR, Santos LT, de Souza AA, Da Silva LG Jr, Chianca DA Jr, de Menezes RC (2014). Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. *Neuroscience* 262: 21-30.
- Ahima RS (2008). Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J. Clin. Invest.* 118(7): 2380-3.
- Ahmed T, Javed S, Tariq A, Budzyńska B, D'Onofrio G, Daglia M, Nabavi SF, Nabavi SM (2017). Daidzein and its Effects on Brain. *Curr. Med. Chem.* 24(4): 365-375.
- Ahmet I, Tae HJ, Lakatta EG, Talan M (2017). Long-term low dose dietary resveratrol supplement reduces cardiovascular structural and functional deterioration in chronic heart failure in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95(3): 268-274.
- Akkerman S, Prickaerts J, Steinbusch HW, Blokland A (2012b). Object recognition testing: Statistical considerations. *Behav. Brain Res.* 232: 317-22.
- Alamuddin N, Bakizada Z, Wadden TA (2016). Management of Obesity. *J. Clin. Oncol.* 34(35): 4295-4305.
- Alò R, Avolio E, Mele M, Fazzari G, Carelli A, Facciolo RM, Canonaco M (2017). Role of Leptin and Orexin-A Within the Suprachiasmatic Nucleus on Anxiety-Like Behaviors in Hamsters. *Mol. Neurobiol.* 54(4): 2674-2684.
- André C, Dinel AL, Ferreira G, Layé S, Castanon N (2014). Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav. Immun.* 41: 10-21.
- Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S (2017). Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 18(11).
- Antonelli T, Fuxe K, Tomasini MC, Mazzoni E, Agnati LF, Tanganelli S, Ferraro L (2007). Neurotensin receptor mechanisms and its modulation of glutamate transmission in the brain: relevance for neurodegenerative diseases and their treatment. *Prog. Neurobiol.* 83(2): 92-109.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14: 351-355.
- Argente-Arizón P, Díaz F, Ros P, Barrios V, Tena-Sempere M, García-Segura LM, Argente J, Chowen JA (2017). The hypothalamic inflammatory/gliosis response to neonatal overnutrition is sex and age dependent. *Endocrinology*.
- Arlt JM, Smutzer GS, Chen EY (2017). Taste assessment in normal weight and overweight individuals with co-occurring Binge Eating Disorder. *Appetite* 113: 239-245.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD (2003). Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol.* 55(2): 241-69.
- Asokan Shibu M, Kuo WW, Kuo CH, Day CH, Shen CY, Chung LC, Lai CH, Pan LF, Vijaya Padma V, Huang CY (2017). Potential phytoestrogen alternatives exert cardio-protective mechanisms via estrogen receptors. *Biomedicine (Taipei)* 7(2): 11.

- Atkinson C, CL Frankenfeld, JW (2005). Lampe, Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental biology and medicine* 230(3): 155-170.
- Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B (2017). Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother* 93: 218-229.
- Baltadjiev AG, Vladeva SV (2014). Correlations between human somatotype components and some anthropometric parameters in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)* 56(3): 175-81.
- Bambace C, Pedrotti M, Ferrara G, Zamboni M (2011). Obesità, tessuto adiposo e infiammazione. *Biochimica Clinica*, vol. 35, n. 4
- Barber TM, Begbie H, Levy J (2010). The incretin pathway as a new therapeutic target for obesity. *Maturitas* 67(3): 197-202.
- Bastos CP, Pereira LM, Ferreira-Vieira TH, Drumond LE, Massensini AR, Moraes MF, Pereira GS (2015). Object recognition memory deficit and depressive-like behavior caused by chronic ovariectomy can be transiently recovered by the acute activation of hippocampal estrogen receptors. *Psychoneuroendocrinology* 57: 14-25.
- Bauco P, Rompré PP (2003). Differential sensitivity to neurotensin-induced hypothermia, but not analgesia, in Fischer and Lewis rats. *Peptides* 24(8): 1189-94.
- Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6(3): 343-68.
- Beeler JA, Faust RP, Turkson S, Ye H, Zhuang X (2016). Low Dopamine D2 Receptor Increases Vulnerability to Obesity Via Reduced Physical Activity, Not Increased Appetitive Motivation. *Biol. Psychiatry* 79: 887-97.
- Belsham DD, Cai F, Cui H, Smukler SR, Salapatek AM, Shkreta L (2004). Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders. *Endocrinology* 145(1): 393-400.
- Bernal-Mondragón C, Arriaga-Avila V, Martínez-Abundis E, Barrera-Mera B, Mercado-Gómez O, Guevara-Guzmán R (2017). Effects of repeated 9 and 30-day exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on social recognition behavior and estrogen receptors expression in olfactory bulb of Wistar female rats. *Neurol Res.* 39(2): 165-175.
- Berthoud HR (2004). Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol. Behav.* 81: 781-793.
- Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM (2013). Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell.* 155(6): 1337-50.
- Bhatarai K, Adhikari S, Fujitani M, Kishida T (2017). Dietary daidzein, but not genistein, has a hypocholesterolemic effect in non-ovariectomized and ovariectomized female Sprague-Dawley rats on a cholesterol-free diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(9): 1805-1813.
- Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB (2001). The role of neurotensin in the pathophysiology of schizophrenia and the mechanism of action of antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry* 50(11): 856-72.
- Bing C (2015). Is interleukin-1 $\beta$  a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte.* 4(2): 149-52.

- Bjursell M, Gerdin A K, Lelliott C J, Egecioglu E, Elmgren A, Törnell J, et al, (2008). Acutely reduced locomotor activity is a major contributor to Western diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: 251–260.
- Blake C, Fabick KM, Setchell KD, Lund TD, Lephart ED (2011). Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects. *BMC Neurosci.* 12: 28.
- Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 95: 161.
- Bodenlos JS, Lemon SC, Schneider KL, August MA, Pagoto SL (2011). Associations of mood and anxiety disorders with obesity: comparisons by ethnicity. *J Psychosom Res.* 71(5): 319-24.
- Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Layé S, Ferreira G (2014). Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun* 40: 9–17.
- Boitard C, Maroun M, Tantot F, Cavaroc A, Sauvant J, Marchand A, Layé S, Capuron L, Darnaudery M, Castanon N, Coutureau E, Vouimba RM, Ferreira G (2015). Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. *J. Neurosci.* 35: 4092–4103.
- Boitard C, Parkes SL, Cavaroc A, Tantot F, Castanon N, Layé S, Tronel S, Pacheco-Lopez G, Coutureau E, Ferreira G (2016). Switching adolescent high-fat diet to adult control diet restores neurocognitive alterations. *Front Behav. Neurosci.* 10: 225.
- Borroto-Escuela DO, Pintsuk J, Schäfer T, Friedland K, Ferraro L, Tanganelli S, Liu F, Fuxe K (2016). Multiple D2 heteroreceptor complexes: new targets for treatment of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol.* 6(2): 77-94.
- Bose P, Rompré PP, Warren RA (2015). Neurotensin enhances glutamatergic EPSCs in VTA neurons by acting on different neurotensin receptors. *Peptides* 73: 43-50.
- Bossard C, Souazé F, Jarry A, Bezieau S, Mosnier JF, Forgez P, Labois CL (2007). Over-expression of neurotensin high-affinity receptor 1 (NTS1) in relation with its ligand neurotensin (NT) and nuclear beta-catenin in inflammatory bowel disease-related oncogenesis. *Peptides.* 28(10): 2030-5.
- Boules M, Cusack B, Zhao L, Fauq A, McCormick DJ, Richelson E (2000). A novel neurotensin peptide analog given extracranially decreases food intake and weight in rodents. *Brain Res.* 865(1): 35-44.
- Boules M, Li Z, Smith K, Fredrickson P, Richelson E (2013). Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4: 36.
- Boules M, Netz R, Fredrickson PA, Richelson E (2016). A neurotensin analog blocks cocaine-conditioned place preference and reinstatement. *Behav. Pharmacol.* 27(2-3 Spec Issue): 236-9.
- Braneky KL, Niswender KD, Pendergast JS (2015). Disruption of Daily Rhythms by High-Fat Diet Is Reversible. *PLoS One* 10(9): e0137970.
- Briody S, Boules M, Oliveros A, Fauq I, Richelson E (2010). Chronic NT69L potently prevents drug-induced disruption of prepulse inhibition without causing tolerance. *Behav. Brain Res* 207(1): 118-24.



- Brown JA, Bugescu R, Mayer TA, Gata-Garcia A, Kurt G, Woodworth HL, Leininger GM (2017). Loss of Action via Neurotensin-Leptin Receptor Neurons Disrupts Leptin and Ghrelin-Mediated Control of Energy Balance. *Endocrinology* 158(5): 1271-1288.
- Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC (2012). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15: 798-808.
- Burguete MC *et al* (2006). Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Neuroscience* 23(3): 703-710.
- Burnie D, Wilson D (2005). Animal. Hong Kong, China: L. Rex Printing Ltd.
- Cai G, Dinan T, Barwood JM, De Luca SN, Soch A, Ziko I, Chan SM, Zeng XY, Li S, Molero J, Spencer SJ (2015). Neonatal overfeeding attenuates acute central pro-inflammatory effects of short-term high fat diet. *Front Neurosci.* 8: 446.
- Cai G, Ziko I, Barwood J, Soch A, Sominsky L, Molero JC, Spencer SJ (2016). Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: a role for adrenal melanocortin 2 receptors. *Sci Rep.* 6: 21097.
- Campfield LA and Smith J (1999). The pathogenesis of obesity, Vol: 13,1: 13-30.
- Canonaco M, Giusi G, Madeo A, Facciolo RM, Lappano R, Canonaco A, Maggiolini M (2008). A sexually dimorphic distribution pattern of the novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 in some brain areas of the hamster. *J. Endocrinol.* 196(1): 131-8.
- Carter S, Caron A, Richard D, Picard F (2013). Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin. Interv. Aging* 8: 829-44.
- Cavallini DC, Manzoni MS, Bedani R, Roselino MN, Celiberto LS, Vendramini RC, de Valdez G, Abdalla DS, Pinto RA, Rosetto D, Valentini SR, Rossi EA (2016). Probiotic Soy Product Supplemented with Isoflavones Improves the Lipid Profile of Moderately Hypercholesterolemic Men: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 8(1).
- Cederroth CR, Nef S (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304(1-2): 30-42.
- Chakraborty TR, Donthireddy L, Adhikary D, Chakraborty S (2016). Long-Term High Fat Diet Has a Profound Effect on Body Weight, Hormone Levels, and Estrous Cycle in Mice. *Med. Sci. Monit.* 22: 1601-8.
- Chambers JB, Schurdak JD, Benoit SC, Clegg DJ (2007). Behavioral and metabolic phenotyping of GPR30 and neuronal estrogen- $\alpha$  receptor- knockout mice. *Appetite* 49: 272-341.
- Chan, P.H., Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21(1): 2-14.
- Chandsawangbhuwana C, Baker ME (2014). 3D models of human ER $\alpha$  and ER $\beta$  complexed with coumestrol. *Steroids* 80: 37-43.
- Chang CH, Grace AA (2014). Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity after chronic mild stress in rats. *Biol Psychiatry* 76(3): 223-30.

- Chau N, Chau K, Mayet A, Baumann M, Legleye S, Falissard B (2013). Self-reporting and measurement of body mass index in adolescents: refusals and validity, and the possible role of socioeconomic and health-related factors. *BMC Public Health* 13: 815.
- Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2013). Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* 27(6): 669-84.
- Cheke LG, Simons JS, Clayton NS (2016). Higher body mass index is associated with episodic memory deficits in young adults. *Q. J. Exp. Psychol. (Hove)* 69(11): 2305-16.
- Cheke LG, Bonnici HM, Clayton NS, and Simons JS (2017). Obesity and insulin resistance are associated with reduced activity in core memory regions of the brain. *Neuropsychologia* 96: 137-149.
- Chen C, Zhang Q, Liu S, Lambrechts M, Qu Y, You Z (2014). AZD5363 Inhibits Inflammatory Synergy between Interleukin-17 and Insulin/Insulin-Like Growth Factor 1. *Front Oncol.* 4: 343.
- Chen L, Chen R, Wang H, Liang F (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int. J. Endocrinol.* 2015: 508409.
- Cheong SH, Furuhashi K, Ito K, Nagaoka M, Yonezawa T, Miura Y, Yagasaki K (2014). Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in Type 2 diabetic model mice. *J. Nutr. Biochem.* 25(2): 136-43.
- Chin-Chance C Polonsky KS, Schoeller DA (2000). Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2685-2691.
- Chinta SJ, Ganesan A, Reis-Rodrigues P, Lithgow GJ, Andersen JK (2013). Anti-inflammatory role of the isoflavone daidzein in lipopolysaccharide-stimulated microglia: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 23(2): 145-53.
- Clark RE, Zola SM, Squire LR (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci.* 20: 8853-60.
- Clarke MA, Stefanidis A, Spencer SJ (2012). Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. *J. Neuroendocrinol.* 24(3): 511-24
- Cooke JH, Patterson M, Patel SR, Smith KL, Ghatei MA, Bloom SR, Murphy KG (2009). Peripheral and central administration of xenin and neurotensin suppress food intake in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 17(6): 1135-43.
- Cooke AA, Connaughton RM, Lyons CL, McMorrow AM, Roche HM (2016). Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* 785: 207-214.
- Cornier MA, Salzberg AK, Endly DC, Bessesen DH, Rojas DC, Tregellas JR (2009). The effects of overfeeding on the neuronal response to visual food cues in thin and reduced-obese individuals. *PLoS One* 4(7): e6310.
- Costa RR, Villela NR, Souza Md, Boa BC, Cyrino FZ, Silva SV, Lisboa PC, Moura EG, Barja-Fidalgo TC, Bouskela E (2011). High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc. Res.* 82(3): 416-22.
- Covasa M (2010). Deficits in gastrointestinal responses controlling food intake and body weight. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299: 1423-39.

- Cox AR, Lam CJ, Rankin MM, King KA, Chen P, Martinez R, Li C, Kushner JA (2016). Extreme obesity induces massive beta cell expansion in mice through self-renewal and does not alter the beta cell lineage. *Diabetologia* 59(6): 1231-41.
- Crespillo A, Alonso M, Vida M, Pavón FJ, Serrano A, Rivera P, Romero-Zerbo Y, Fernández-Llebrez P, Martínez A, Pérez-Valero V, Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, de Fonseca FR (2011). Reduction of body weight, liver steatosis and expression of stearyl-CoA desaturase 1 by the isoflavone daidzein in diet-induced obesity. *Br. J. Pharmacol.* 64(7): 1899-915.
- Da Silva L, Neves BM, Moura L, Cruz MT, Carvalho E (2011). Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813(10): 1863-71.
- Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, Botto JM, Mazella J, Vincent JP (2001). Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 92(4): 503-9
- Dal Negro RW and Visconti M (2016). Erdosteine reduces the exercise-induced oxidative stress in patients with severe COPD: Results of a placebo-controlled trial. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 41: 48-51.
- Dalbøge LS, Pedersen PJ, Hansen G, Fabricius K, Hansen HB, Jelsing J, Vrang N (2015). A Hamster Model of Diet-Induced Obesity for Preclinical Evaluation of Anti-Obesity, Anti-Diabetic and Lipid Modulating Agents. *PLoS One.* 10(8): e0135634.
- Davis C, Curtis C, Levitan RD, Carter JC, Kaplan AS, Kennedy JL (2011). Evidence that ‘food addiction’ is a valid phenotype of obesity. *Appetite* 57: 711-717.
- Davis C, Levitan RD, Kaplan AS, Kennedy JL, Carter JC (2014). Food cravings, appetite, and snack-food consumption in response to a psychomotor stimulant drug: the moderating effect of “food-addiction.” *Front. Psychol.* 5: 403.
- De Araujo IE (2016). Circuit organization of sugar reinforcement. *Physiol. Behav.* 164(Pt B): 473-477.
- De Figueiredo PRL, de Albuquerque Siebra AL, de Lacerda Neto LJ, de Oliveira LR, Barbosa Ramos AG et al, Gyllyandeson de Araújo Delmondes, Izabel Cristina Santiago Lemos, Cícera Norma (2015). Obesity and Natural Products. *Journal of Food and Nutrition Research* 8: 540-549.
- De Jonghe BC, Hayes MR, Zimmer DJ, Kanoski SE, Grill HJ, Bence KK (2012). Food intake reductions and increases in energetic responses by hindbrain leptin and melanotan II are enhanced in mice with POMC-specific PTP1B deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(5): E644-51.
- De Kloet AD and Herman JP (2017). Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. *Front. Neuroendocrinol.* pii: S0091-3022(17)30065-1.
- De Noronha SR, Campos GV, Abreu AR, de Souza AA, Chianca DA Jr, de Menezes RC (2017). High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. *Behav. Brain Res.* 316: 38-46.
- Desai HR, Sivasubramaniyam T, Revelo XS, Schroer SA, Luk CT, Rikkala PR, Metherel AH, Dodington DW, Park YJ, Kim MJ, Rapps JA, Besla R, Robbins CS, Wagner KU, Bazinet RP, Winer DA, Woo M (2017). Macrophage JAK2 deficiency protects against high-fat diet-induced inflammation. *Sci Rep.* 7(1): 7653.
- Devore EE, Stampfer MJ, Breteler MM, Rosner B, Kang JH, Okereke O, Hu FB, Grodstein F (2009). Dietary fat intake and cognitive decline in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32(4): 635-40.

- Dias V, Junn E, Mouradian MM (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 3(4): 461-91.
- Dicou E. Neurotensin protects pancreatic beta cells from serum deprivation (2008). *Arch. Physiol. Biochem.* 114(5): 299-300.
- Dijkman PM, Watts A (2015). Lipid modulation of early G protein-coupled receptor signalling events. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848(11 Pt A): 2889-97.
- Dillard A, Matthan NR, Lichtenstein AH (2010). Use of hamster as a model to study diet-induced atherosclerosis. *Nutr. Metab.* 7: 89.
- Djogo T, Robins SC, Schneider S, Kryzskaya D, Liu X, Mingay A, Gillon CJ, Kim JH, Storch KF, Boehm U, Bourque CW, Stroh T, Dimou L, Kokoeva MV (2016). Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell. Metab.* 23(5): 797-810.
- Dobner PR (2005). Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(17): 1946-63.
- Dornas WC, Oliveira TT, Dores RGR, Fabres MHA, Nagem TJ (2009). “Efeitos Antidiabéticos de Plantas Mediciniais”. *Rev. bras. farmacogn.* 19: 488-500.
- Druce MR (2004). Small CK, Bloom SR. Minireview: Gut peptides regulating satiety. *Endocrinology* 145: 2660-2665.
- Du GM, Wu JG, Luo BP, Hu ZH, Li LA, Liu MJ (2016). RNAi-mediated Ghrelin affects gastric H(+)-K(+)-ATPase activity and expression of GOAT-Ghrelin system in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 228: 48-52.
- Du Y, Li S, Cui CJ, Zhang Y, Yang SH, Li JJ (2016). Leptin decreases the expression of low-density lipoprotein receptor via PCSK9 pathway: linking dyslipidemia with obesity. *J. Transl. Med.* 14: 276.
- Du Y, Li S, Cui CJ, Zhang Y, Yang SH, Li JJ (2016). Leptin decreases the expression of low-density lipoprotein receptor via PCSK9 pathway: linking dyslipidemia with obesity. *J. Transl. Med.* 14: 276.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 79-101.
- Dutheil S, Ota KT, Wohleb ES, Rasmussen K, Duman RS (2016). High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. *Neuropsychopharmacology* 41(7): 1874-87.
- Eichen DM, Matheson BE, Appleton-Knapp SL, Boutelle KN (2017). Neurocognitive Treatments for Eating Disorders and Obesity. *Curr. Psychiatry Rep.* 19(9): 62.
- Eik W Filho, Marcon SS, Krupek T, Previdelli IT, Pereira OC, Silva MA, Bazotte RB (2016). Blood levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during an oral glucose tolerance test in patients with symptoms suggesting reactive hypoglycemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49(8).
- Eljaafari A, Robert M, Chehimi M, Chanon S, Durand C, Vial G, Bendridi N, Madec AM, Disse E, Laville M, Rieusset J, Lefai E, Vidal H, Pirola L (2015). Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* 64(7): 2477-88.
- Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S (2005). Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav. Brain Res.*

- Eskelinen MH, Ngandu T, Helkala EL, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, Kivipelto M (2008). Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 23(7): 741-7.
- Facciolo RM, Crudo M, Zizza M, Giusi G, Canonaco M (2012).  $\alpha$  GABA(A) subunit-orexin receptor interactions activate learning/motivational pathways in the goldfish. *Behav. Brain Res.* 234(2): 349-56.
- Farzaneh S, Zarghi A (2016). Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013-2015). *Sci. Pharm.* 84(3): 409-427.
- Fatima N, Faisal SM, Zubair S, Siddiqui SS, Moin S, Owais M (2017). Emerging role of Interleukins IL-23/IL-17 axis and biochemical markers in the pathogenesis of Type 2 Diabetes: Association with age and gender in human subjects. *Int. J. Biol. Macromol.* 105(Pt 1): 1279-1288.
- Feifel D, Melendez G, Shilling PD (2003). A systemically administered neurotensin agonist blocks disruption of prepulse inhibition produced by a serotonin-2A agonist. *Neuropsychopharmacology* 28(4): 651-3.
- Feifel D, Shilling PD, Fazlinejad AA, Melendez G (2016). Antipsychotic drug-like facilitation of latent inhibition by a brain-penetrating neurotensin-1 receptor agonist. *J. Psychopharmacol.* 30(3): 312-7.
- Felszeghy K, Espinosa JM, Scarna H, Béroud A, Rostène W, Pélaprat D (2007). Neurotensin receptor antagonist administered during cocaine withdrawal decreases locomotor sensitization and conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology* 32(12):2601-10.
- Feng YP, Wang J, Dong YL, Wang YY, Li YQ (2015). The roles of neurotensin and its analogues in pain. *Curr. Pharm.* 21(7): 840-8.
- Fernandes MF, Matthys D, Hryhorczuk C, Sharma S, Mogra S, Alquier T, Fulton S (2015). Leptin Suppresses the Rewarding Effects of Running via STAT3 Signaling in Dopamine Neurons. *Cell. Metab.* 22(4): 741-9.
- Ferraro L, Beggiato S, Borroto-Escuela DO, Ravani L, O'Connor WT, Tomasini MC, Borelli AC, Agnati LF, Antonelli T, Tanganelli S, Fuxe K (2014). Neurotensin NTS1-dopamine D2 receptor-receptor interactions in putative receptor heteromers: relevance for Parkinson's disease and schizophrenia. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15(7): 681-90.
- Figlewicz DP, Higgins MS, Ng-Evans SB, Havel PJ (2001). Leptin reverses sucrose-conditioned place preference in food-restricted rats. *Physiol. Behav.* 73(1-2): 229-34.
- Figlewicz DP, Bennett J, Evans SB, Kaiyala K, Sipols AJ, Benoit SC (2004). Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. *Behav. Neurosci.* 118: 479-87.
- Figlewicz DP, Sipols AJ (2010). Energy regulatory signals and food reward. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97: 15-24.
- File SE, Jarrett N, Fluck E, Duffy R, Casey K, Wiseman H (2001). Eating soya improves human memory. *Psychopharmacology (Berl)* 157(4): 430-6.
- Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M (2011). Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377(9765): 557-67.

- Fontes MA, Xavier CH, De Menezes RC, Dimicco JA (2011). The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* 184: 64-74.
- Francis HM, Stevenson RJ (2011). Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. *Behav. Neurosci.* 125(6): 943-55.
- Fred-Jiménez RM, Arroyo-Ávila M, Mayor ÁM, Ríos G, Vilá LM (2016). Clinical Manifestations Associated with Overweight/Obesity in Puerto Ricans with Fibromyalgia Syndrome. *J. Obes.* 2016:1379289.
- Fu LY, Acuna-Goycolea C, van den Pol AN (2004). Neuropeptide Y inhibits hypocretin/orexin neurons by multiple presynaptic and postsynaptic mechanisms: tonic depression of the hypothalamic arousal system. *J. Neurosci.* 24(40): 8741-51.
- Fujitani M, Mizushige T, Bhattarai K, Iwahara A, Aida R, Segawa T, Kishida T (2015). Dynamics of appetite-mediated gene expression in daidzein-fed female rats in the meal-feeding method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79(8): 1342-9.
- Fulton S (2010). Appetite and reward. *Front. Neuroendocrinol.* 31(1): 85-103.
- Gadde KM, Pritham Raj Y (2017). Pharmacotherapy of Obesity: Clinical Trials to Clinical Practice. *Curr. Diab. Rep.* 17(5): 34.
- Gaffrey MS, Barch DM, Bogdan R, Farris K, Petersen SE, Luby JL (2017). Amygdala Reward Reactivity Mediates the Association Between Preschool Stress Response and Depression Severity. *Biol. Psychiatry.*
- Gahete MD, Rubio A, Córdoba-Chacón J, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Avila J, Luque RM, Castaño JP (2010). Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 22(3): 819-28.
- Galbraith NJ, Manek S, Walker S, Bishop C, Carter JV, Cahill M, Gardner SA, Polk HC Jr, Galandiuk S (2017). The effect of IκK-16 on lipopolysaccharide-induced impaired monocytes. *Immunobiology.*
- Gancheva SM, Zhelyazkova-Savova MD (2016). Vitamin K2 Improves Anxiety and Depression but not Cognition in Rats with Metabolic Syndrome: a Role of Blood Glucose? *Folia Med. (Plovdiv)* 58(4): 264-272.
- Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, García-Cáceres C, De la Fuente E, Mergen C, Bour S, Thaler JP, Seeley RJ, Filosa J, Stern JE, Perez-Tilve D, Schwartz MW, Tschöp MH, Yi CX (2014). Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* 62: 17-25.
- Gariepy G, Nitka D, Schmitz N (2010). The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes. (Lond)* 34(3): 407-19.
- Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, Nadolsky K, Pessah-Pollack R, Plodkowski R (2016). Reviewers of the AACE/ACE Obesity Clinical Practice Guidelines. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity executive summary Complete Guidelines available at <https://www.aace.com/publications/guidelines>. *Endocr. Pract.* 22(7): 842-84.
- Gattermann R, Fritzsche P, Neumann K, Al-Hussein I, Kayser A, Abiad R M Yakti (2001). Notes on the current distribution and the ecology of wild golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Zoo.* 254: 359-365.

- Geisler S, Zahm DS (2006). On the retention of neurotensin in the ventral tegmental area (VTA) despite destruction of the main neurotensinergic afferents of the VTA--implications for the organization of forebrain projections to the VTA. *Brain Res.* 1087(1): 87-104.
- Gendron L, Perron A, Payet MD, Gallo-Payet N, Sarret P, Beaudet A (2004). Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol. Pharmacol.* 66(6): 1421-30.
- Gild P, Ehdaie B, Kluth LA (2017). Effect of obesity on bladder cancer and renal cell carcinoma incidence and survival. *Curr. Opin. Urol.* 27(5): 409-414.
- Giordano V, Peluso G, Iannuccelli M, Benatti P, Nicolai R, Calvani M (2007). Systemic and brain metabolic dysfunction as a new paradigm for approaching Alzheimer's dementia. *Neurochem. Res.* 32(4-5): 555-67.
- Giovannucci E (2007). Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 86(3): 836-42.
- Gleason CE, Fischer BL, Dowling NM, Setchell KD, Atwood CS, Carlsson CM, Asthana S (2015). Cognitive Effects of Soy Isoflavones in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 47(4): 1009-19.
- Goforth PB, Leininger GM, Patterson CM, Satin LS, Myers MG Jr (2014). Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 34(34): 11405-15.
- Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D (2003). Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. *Menopause* 10(5): 427-32.
- Graßmann S, Wirsching J, Eichelmann F, Aleksandrova K (2017). Association Between Peripheral Adipokines and Inflammation Markers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obesity (Silver Spring)* 25(10): 1776-1785.
- Granata GP and Brandon LJ (2002). The thermic effect of food and obesity: discrepant results and methodological variations. *Nutr. Rev.* 60(8): 223-33.
- Guha S, Lunn JA, Santiskulvong C, Rozengurt E (2003). Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res.* 63(10): 2379-87.
- Guo Y, Wu G, Su X, Yang H, Zhang J (2009). Antiobesity action of a daidzein derivative on male obese mice induced by a high-fat diet. *Nutr. Res.* 29(9): 656-63.
- Haase C, Bergmann R, Oswald J, Zips D, Pietzsch J (2006). Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 26(5A): 3527-33.
- Haghighatdoost F, Nobakht M Gh BF, Hariri M (2018). Effect of green tea on plasma leptin and ghrelin levels: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Nutrition* 45: 17-23.
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94(16): 8878-83.
- Han TS, Correa E, Lean ME, Lee DM, O'Neill TW, Bartfai G, Forti G, Giwercman A, Kula K, Pendleton N, Punab M, Rutter MK, Vanderschueren D, Huhtaniemi IT, Wu FC, Casanueva FF, and the EMAS Study Group (2017). Changes in prevalence of obesity and high waist circumference over four years across European regions: the European male ageing study (EMAS). *Endocrine* 55(2): 456-469.

- Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung B, Kelland L, Jamieson S, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherzadeh A, Foxton C, Boakes A, Farooq M, Maru D, Diagaradjane P, Matsuo Y, Sinnott-Smith J, Gelovani J, Krishnan S, Aggarwal BB, Rozengurt E, Ireson CR, Guha S (2010). A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 9(5): 1136-46.
- Hassouna R, Labarthe A, Tolle V (2016). Hypothalamic regulation of body growth and appetite by ghrelin-derived peptides during balanced nutrition or undernutrition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 438: 42-51.
- Hayamizu K, Ishii Y, Kaneko I, Shen M, Okuhara Y, Shigematsu N, Tomi H, Furuse M, Yoshino G, Shimasaki H (2003). Effects of garcinia cambogia (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 64(8): 551-67.
- Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, Deuretzbacher G, Hansen-Algenstaedt N, Beil FU, Algenstaedt P (2007). TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm. Metab. Res.* 39(4): 250-5.
- Heo HJ, Suh YM, Kim MJ, Choi SJ, Mun NS, Kim HK, Kim E, Kim CJ, Cho HY, Kim YJ, Shin DH (2006). Daidzein activates choline acetyltransferase from MC-IXC cells and improves drug-induced amnesia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(1): 107-11.
- Hernandez-Chan NG, Bannon MJ, Orozco-Barrios CE, Escobedo L, Zamudio S, De la Cruz F, Gongora-Alfaro JL, Armendáriz-Borunda J, Reyes-Corona D, Espadas-Alvarez AJ, Flores-Martínez YM, Ayala-Davila J, Hernandez-Gutierrez ME, Pavón L, García-Villegas R, Nadella R, Martinez-Fong D (2015). Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease. *J. Biomed. Sci.* 22: 59.
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC (2012). Energy balance and obesity. *Circulation* 126(1): 126-32.
- Hillhouse TM, Prus AJ (2013). Effects of the neurotensin NTS<sub>1</sub> receptor agonist PD149163 on visual signal detection in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 721(1-3): 201-7.
- Hills AP, Andersen LB, Byrne NM (2011). Physical activity and obesity in children. *Br. J. Sports Med.* 45(11): 866-70.
- Hirsch D, Zukowska Z (2012). NPY and stress 30 years later: the peripheral view. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32: 645-59.
- Holzer P, Reichmann F, Farzi A (2012). Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides* Dec 46(6): 261-74.
- Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron.* 51(6): 801-10.
- Hong CP, Park A, Yang BG, Yun CH, Kwak MJ, Lee GW, Kim JH, Jang MS, Lee EJ, Jeun EJ, You G, Kim KS, Choi Y, Park JH, Hwang D, Im SH, Kim JF, Kim YK, Seoh JY, Surh CD, Kim YM, Jang MH (2017). Gut-Specific Delivery of T-Helper 17 Cells Reduces Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Gastroenterology.* 152(8): 1998-2010.
- Hong S, Yu JW (2017). Prolonged exposure of lipopolysaccharide induces NLRP3-independent maturation and secretion of interleukin (IL)-1 $\beta$  in macrophages. *J. Microbiol. Biotechnol.*
- Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Brönneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschöp MH (2010). Synaptic



input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107(33): 14875-80.

Huang M, Cheng G, Tan H, Qin R, Zou Y, Wang Y, Zhang Y (2017). Capsaicin protects cortical neurons against ischemia/reperfusion injury via down-regulating NMDA receptors. *Exp. Neurol.* 295: 66-76.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001). Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14(6): 705-14.

Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* 11(1): 11-8.

Illison J, Tian L, McClafferty H, Werno M, Chamberlain LH, Leiss V, Sassmann A, Offermanns S, Ruth P, Shipston MJ, Lukowski R (2016). Obesogenic and Diabetogenic Effects of High-Calorie Nutrition Require Adipocyte BK Channels. *Diabetes* 65(12): 3621-3635.

Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM (2001). Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem.* Jun 22;276(25):22788-96.

Jan AT, Azam M, Rahman S, Almigeiti AMS, Choi DH, Lee EJ, Haq QMR, Choi I (2017). Perspective Insights into Disease Progression, Diagnostics, and Therapeutic Approaches in Alzheimer's Disease: A Judicious Update. *Front. Aging Neurosci.* 9: 356.

Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Douhan A, Svensson L, Engel JA (2007). Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addict. Biol.* 12(1): 6-16.

Jochem C, Leitzmann M (2016). Obesity and Colorectal Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 208: 17-41.

Jochum F, Altehheld B, Meinardus P, Dahlinger N, Nomayo A, Stehle P (2017). Mothers' Consumption of Soy Drink But Not Black Tea Increases the Flavonoid Content of Term Breast Milk: A Pilot Randomized, Controlled Intervention Study. *Ann. Nutr. Metab.* 70(2): 147-153.

Johnson PM, Kenny PJ (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat. Neurosci* 13: 635–641.

Johnson MD, Bouret SG, Dunn-Meynell AA, Boyle CN, Lutz TA, Levin BE (2016). Early postnatal amylin treatment enhances hypothalamic leptin signaling and neural development in the selectively bred diet-induced obese rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 311(6):1032-1044.

Johnson MR, Shkura K, Langley SR, Delahaye-Duriez A, Srivastava P, Hill WD, Rackham OJ, Davies G, Harris SE, Moreno-Moral A, Rotival M, Speed D, Petrovski S, Katz A, Hayward C, Porteous DJ, Smith BH, Padmanabhan S, Hocking LJ, Starr JM, Liewald DC, Visconti A, Falchi M, Bottolo L, Rossetti T, Danis B, Mazzuferi M, Foerch P, Grote A, Helmstaedter C, Becker AJ, Kaminski RM, Deary IJ, Petretto E (2016). Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nat. Neurosci.* 2: 223-32

Jomphe C, Lemelin PL, Okano H, Kobayashi K, Trudeau LE (2006). Bidirectional regulation of dopamine D2 and neurotensin NTS1 receptors in dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.* 24(10): 2789-800.

Jovanovic Z, Tung YC, Lam BY, O'Rahilly S, Yeo GS (2010). Identification of the global transcriptomic response of the hypothalamic arcuate nucleus to fasting and leptin. *J. Neuroendocrinol.* 22(8): 915-25.

- Jungbauer A, Medjakovic S (2014). Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139: 277-89.
- Kaczmarczyk MM, Machaj AS, Chiu GS, Lawson MA, Gainey SJ, York JM, Meling DD, Martin SA, Kwakwa KA, Newman AF, Woods JA, Kelley KW, Wang Y, Miller MJ, Freund GG (2013). Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. *Psychoneuroendocrinology* 38(9): 1553-64.
- Kalafatakis K, Triantafyllou K (2011). Contribution of neurotensin in the immune and neuroendocrine modulation of normal and abnormal enteric function. *Regul. Pept.* 170(1-3): 7-17.
- Kalarchian MA, Marcus MD (2012). Psychiatric comorbidity of childhood obesity. *Int. Rev. Psychiatry* 24(3): 241-6.
- Kaludjerovic J, Chen J, Ward WE (2012). Early life exposure to genistein and daidzein disrupts structural development of reproductive organs in female mice. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 75(11): 649-60.
- Kamiński K, Kujdowicz M, Kajta M, Nowakowska M, Szczubiałka K (2015). Enhanced delivery of daidzein into fibroblasts and neuronal cells with cationic derivatives of gamma-cyclodextrin for the control of cellular glycosaminoglycans. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 91: 111-9.
- Kang DH, Heo RW, Yi CO, Kim H, Choi CH, Roh GS (2015). High-fat diet-induced obesity exacerbates kainic acid-induced hippocampal cell death. *BMC Neurosci.* 16: 72.
- Kanoski SE, Hayes MR, Greenwald HS, Fortin SM, Gianessi CA, Gilbert JR, Grill HJ (2011). Hippocampal leptin signaling reduces food intake and modulates food-related memory processing. *Neuropsychopharmacology* 36(9): 1859-70.
- Karelina K, Sarac B, Freeman LM, Gaier KR, Weil ZM (2016). Traumatic brain injury and obesity induce persistent central insulin resistance. *Eur. J. Neurosci* 43(8): 1034-43.
- Kean RJ, Lamport DJ, Dodd GF, Freeman JE, Williams CM, Ellis JA, Butler LT, Spencer JP (2015). Chronic consumption of flavanone-rich orange juice is associated with cognitive benefits: an 8-wk, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 101(3): 506-14.
- Kenny PJ (2011). Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron.* 69(4): 664-79.
- Khodamoradi M, Asadi-Shekaari M, Esmaeili-Mahani S, Esmailpour K, Sheibani V (2016). Effects of genistein on cognitive dysfunction and hippocampal synaptic plasticity impairment in an ovariectomized rat kainic acid model of seizure. *Eur. J. Pharmacol.* 786: 1-9.
- Khodamoradi M, Asadi-Shekaari M, Esmaeili-Mahani S, Sharififar F, Sheibani V (2017). Effects of Hydroalcoholic Extract of Soy on Learning, Memory and Synaptic Plasticity Deficits Induced by Seizure in Ovariectomized Rats. *Basic. Clin. Neurosci.* 8(5): 395-403.
- Kim JW, *et al* (2001). Daidzein administration *in vivo* reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Life sciences*, 2009 84(7): 227-234.
- Kim ER, Leckstrom A, Mizuno TM (2008). Impaired anorectic effect of leptin in neurotensin receptor 1-deficient mice. *Behav. Brain Res.* 194(1): 66-71.
- Kim ER, Mizuno TM (2010). Role of neurotensin receptor 1 in the regulation of food intake by neuromedins and neuromedin-related peptides. *Neurosci. Lett.* 468(1): 64-7.

- Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, Liu ZW, Zimmer MR, Jeong JK, Szigeti-Buck K, Gao Y, Garcia-Caceres C, Yi CX, Salmaso N, Vaccarino FM, Chowen J, Diano S, Dietrich MO, Tschöp MH, Horvath TL (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17: 908–910.
- Kim H, Kang H, Heo RW, Jeon BT, Yi CO, Shin HJ, Kim J, Jeong SY, Kwak W, Kim WH, Kang SS, Roh GS (2016). Caloric restriction improves diabetes-induced cognitive deficits by attenuating neurogranin-associated calcium signaling in high-fat diet-fed mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36(6): 1098-110.
- Kinkead B, Nemeroff CB (2004). Neurotensin, schizophrenia, and antipsychotic drug action. *Int. Rev. Neurobiol.* 59: 327-49.
- Kisfalvi K, Hurd C, Guha S, Rozengurt E (2010). Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *J. Cell. Physiol.* 223(2): 309-16.
- Kitsios K, Papadopoulou M, Kosta K, Kadoglou N, Papagianni M, Tsiroukidou K (2013). High-sensitivity C-reactive protein levels and metabolic disorders in obese and overweight children and adolescents. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 5(1): 44-9.
- Knoll JG, Krasnow SM, Marks DL (2017). Interleukin-1 $\beta$  signaling in fenestrated capillaries is sufficient to trigger sickness responses in mice. *J. Neuroinflammation.* 14(1): 219.
- Kobilo T, Guerrieri D, Zhang Y, Collica SC, Becker KG, van Praag H (2014). AMPK agonist AICAR improves cognition and motor coordination in young and aged mice. *Learn. Mem.* 21(2): 119-26.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T (2004). Brain-gut axis and its role in control of food intake. *J. Physiolol. Pharmacol.* 55: 137-154.
- Koon HW, Kim YS, Xu H, Kumar A, Zhao D, Karagiannides I, Dobner PR, Pothoulakis C (2009). Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106(21): 8766-71.
- Korde LA, Wu AH, Fears T, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Pike MC, Hoover RN, Ziegler RG (2009). Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(4): 1050-9.
- Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G (2010). Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens. Res.* 33: 386-93.
- Kravitz AV, O'Neal TJ, Friend DM (2016). Do Dopaminergic Impairments Underlie Physical Inactivity in People with Obesity? *Front. Hum. Neurosci.* 14: 10-514.
- Krügel U, Schraft T, Kittner H, Kiess W, Illes P (2003). Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *Eur. J. Pharmacol.* 482(1-3): 185-7.
- Kumahara H, Tanaka H, Schutz Y (2011). Inconspicuous assessment of diet-induced thermogenesis using whole-body indirect calorimetry. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 36(5): 758-63.
- Kumar S, Kelly AS (2017). Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo. Clin. Proc.* 92(2): 251-265.
- Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnanský R, Zukowska Z (2008). Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 148: 232-7.

- Lacroix MC, Caillol M, Durieux D, Monnerie R, Grebert D, Pellerin L, Repond C, Tolle V, Zizzari P, Baly C (2015). Long-Lasting Metabolic Imbalance Related to Obesity Alters Olfactory Tissue Homeostasis and Impairs Olfactory-Driven Behaviors. *Chem. Senses* 40(8): 537-56.
- Laque A, Yu S, Qualls-Creekmore E, Gettys S, Schwartzburg C, Bui K, Rhodes C, Berthoud HR, Morrison CD, Richards BK, Münzberg H (2015). Leptin modulates nutrient reward via inhibitory galanin action on orexin neurons. *Mol. Metab.* 4(10): 706-17.
- László K, Tóth K, Kertes E, Péczely L, Lénárd L (2010). The role of neurotensin in positive reinforcement in the rat central nucleus of amygdala. *Behav. Brain Res.* 208(2): 430-5.
- Law IK, Murphy JE, Bakirtzi K, Bunnett NW, Pothoulakis C (2012). Neurotensin-induced proinflammatory signaling in human colonocytes is regulated by  $\beta$ -arrestins and endothelin-converting enzyme-1-dependent endocytosis and resensitization of neurotensin receptor 1. *J. Biol. Chem.* 287(18): 15066-75.
- Lee HJ, Lim SM, Ko DB, Jeong JJ, Hwang YH, Kim DH (2017). Soyasapogenol B and Genistein Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Mice by the Modulation of NF- $\kappa$ B-Mediated BDNF Expression. *J. Agric. Food. Chem.* 65(32): 6877-6885.
- Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* 22: 6430-6437.
- Léger GC, Massoud F (2013). Novel disease-modifying therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* 6: 423-42.
- Leibowitz SF, Wortley KE (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25(3): 473-504.
- Leighty RE, Nilsson LN, Potter H, Costa DA, Low MA, Bales KR, Paul SM, Arendash GW (2004). Use of multimetric statistical analysis to characterize and discriminate between the performance of four Alzheimer's transgenic mouse lines differing in A $\beta$  deposition. *Behav. Brain Res.* 153(1): 107-21.
- Leininger GM, Opland DM, Jo YH, Faouzi M, Christensen L, Cappellucci LA, Rhodes CJ, Gnegy ME, Becker JB, Pothos EN, Seasholtz AF, Thompson RC, Myers MG Jr (2011). Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell. Metab.* 14(3): 313-23.
- Levitas-Djerbi T, Yelin-Bekerman L, Lerer-Goldshtein T, Appelbaum L (2015). Hypothalamic leptin-neurotensin-hypocretin neuronal networks in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 523(5): 831-48.
- Li Z, Boules M, Williams K, Gordillo A, Li S, Richelson E (2010). Similarities in the behavior and molecular deficits in the frontal cortex between the neurotensin receptor subtype 1 knockout mice and chronic phencyclidine-treated mice: relevance to schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* 40(2): 467-77.
- Li MD (2011). Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight. *Yale J. Biol. Med.* 84(1):1-7.
- Li J, Chen C, Lei X, Wang Y, Chen C, He Q, Moyzis RK, Xue G, Zhu B, Cao Z, Dong Q (2013). The NTSR1 gene modulates the association between hippocampal structure and working memory performance. *Neuroimage* 75: 79-86.
- Li J, Song J, Zaytseva YY, Liu Y, Rychahou P, Jiang K, Starr ME, Kim JT, Harris JW, Yiannikouris FB, Katz WS, Nilsson PM, Orho-Melander M, Chen J, Zhu H, Fahrenholz T, Higashi RM, Gao T, Morris AJ, Cassis LA,

- Fan TW, Weiss HL, Dobner PR, Melander O, Jia J, Evers BM (2016). An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity. *Nature* 533(7603): 411-5.
- Li P, Ma K, Wu HY, Wu YP, Li BX (2017). Isoflavones Induce BEX2-Dependent Autophagy to Prevent ATR-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Cell Physiol Biochem*. 43(5): 1866-1879.
- Li T, Zhang YM, Han D, Hua R, Guo BN, Hu SQ, Yan XL, Xu T (2017). Involvement of IL-17 in Secondary Brain Injury After a Traumatic Brain Injury in Rats. *Neuromolecular Med*. 19(4): 541-554.
- Liang J, Matheson BE, Kaye WH, Boutelle KN (2014). Neurocognitive correlates of obesity and obesity-related behaviors in children and adolescents. *Int. J. Obes*. 38(4): 494-506.
- Liu WK, Sze SC, Ho JC, Liu BP, Yu MC (2004). Wheat germ lectin induces G2/M arrest in mouse L929 fibroblasts. *J. Cell. Biochem*. 91(6): 1159-73.
- Liu Q, Xin W, He P, Turner D, Yin J, Gan Y, Shi FD, Wu J (2014). Interleukin-17 inhibits adult hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep*. 4: 7554.
- Liu H, Wang L, Ma H, Guo R, Kang R, Han J, Dong Z (2015). Coumestrol inhibits carotid sinus baroreceptor activity by cAMP/PKA dependent nitric oxide release in anesthetized male rats. *Biochem. Pharmacol*. 93(1): 42-8.
- Liu Y, Zou T, Wang S, Chen H, Su D, Fu X, Zhang Q, Kang X (2016). Genistein-induced differentiation of breast cancer stem/progenitor cells through a paracrine mechanism. *Int. J. Oncol*. 48(3): 1063-72.
- Liu J, Agopiantz M, Poupon J, Wu Z, Just PA, Borghese B, Ségal-Bendirdjian E, Gauchotte G, Gompel A, Forgez P (2017). Neurotensin Receptor 1 Antagonist SR48692 Improves Response to Carboplatin by Enhancing Apoptosis and Inhibiting Drug Efflux in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res*. 23(21): 6516-6528.
- Liu R, Zhong X, Zeng J, Huang Z, Li X, Xiao H, Chen Q, Li D (2017). 3'-Daidzein sulfonate sodium inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion. *Int. J. Mol. Med*. 39(4): 1021-1028.
- Loum-Ribot E, Lafon P, Chaigniau M, Tramu G, Corio M (2006). Glucocorticoids down-regulate lipopolysaccharide-induced de novo production of neurotensin mRNA in the rat hypothalamic, paraventricular, corticotrophin-releasing hormone neurons. *Neuroimmunomodulation* 13(3): 170-8.
- Loutchanwoot P, Srivilai P, Jarry H (2014). Lack of anti-androgenic effects of equol on reproductive neuroendocrine function in the adult male rat. *Horm. Behav*. 65(1): 22-31.
- Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, Shan Q (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and IκB kinase β/nuclear factor-κB-mediated inflammatory pathways in mice. *Brain Behav. Immun*. 25(8):1658-67.
- Lu Y, Liu Y, Li Y (2014). Comparison of natural estrogens and synthetic derivative on genioglossus function and estrogen receptors expression in rats with chronic intermittent hypoxia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 140: 71-9.
- Lu J, Wu DM, Zheng Loutchanwoot P, Srivilai P, Jarry H (2015). The influence of equol on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and hepatic lipid metabolic parameters in adult male rats. *Life Sci*. 128: 1-7.
- Lu Z, Zhou R, Kong Y, Wang J, Xia W, Guo J, Liu J, Sun H, Liu K, Yang J, Mi M, Xu H (2016). S-equol, a Secondary Metabolite of Natural Anticancer Isoflavone Daidzein, Inhibits Prostate Cancer Growth In Vitro and In Vivo, Though Activating the Akt/FOXO3a Pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* 16(5): 455-65.

- Lund TD, West TW, Tian LY, Bu LH, Simmons DL, et al (2001). Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. *BMC Neurosci.* 2:20.
- Luo XQ, Cai QY, Chen Y, Guo LX, Chen AQ, Wu ZQ, Lin C (2014). Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord contributes to chronic visceral pain in rats. *Brain Res.* 1542: 167-75.
- Lutz TA, Woods SC (2012). Overview of animal models of obesity. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 5: 5-61.
- Ma Y, Sullivan JC, Schreihof DA (2010). Dietary genistein and equol (4', 7 isoflavandiol) reduce oxidative stress and protect rats against focal cerebral ischemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299(3): 871-877.
- Ma XL, Zhang F, Wang YX, He CC, Tian K, Wang HG, An D, Heng B, Liu YQ (2016). Genistein inhibition of OGD-induced brain neuron death correlates with its modulation of apoptosis, voltage-gated potassium and sodium currents and glutamate signal pathway. *Chem. Biol. Interact.* 254: 73-82.
- MacKay H, Charbonneau VR, St-Onge V, Murray E, Watts A, Wellman MK, Abizaid A (2016). Rats with a truncated ghrelin receptor (GHSR) do not respond to ghrelin, and show reduced intake of palatable, high-calorie food. *Physiol. Behav.* 163: 88-96.
- Maioli TU, Gonçalves JL, Miranda MC, Martins VD, Horta LS, Moreira TG, Godard AL, Santiago AF, Faria AM (2016). High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm. Res.* 65(2): 169-78.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013: 139239.
- Marics B, Peitl B, Pázmándi K, Bácsi A, Németh J, Oszlács O, Jancsó G, Dux M (2017). Diet-Induced Obesity Enhances TRPV1-Mediated Neurovascular Reactions in the Dura Mater. *Headache* 57(3): 441-454.
- Marsland AL, McCaffery JM, Muldoon MF, Manuck SB (2010). Systemic inflammation and the metabolic syndrome among middle-aged community volunteers. *Metabolism* 59(12): 1801-8.
- Marsland AL, Gianaros PJ, Kuan DC, Sheu LK, Krajina K, Manuck SB (2015). Brain morphology links systemic inflammation to cognitive function in midlife adults. *Brain Behav. Immun.* 48: 195-204.
- Martin R, Cordova C, Gutiérrez B, Hernández M, Nieto ML (2017). A dangerous liaison: Leptin and sPLA2-IIA join forces to induce proliferation and migration of astrocytoma cells. *PLoS One* 12(3): e0170675.
- Mathey J, et al (2006). Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41(3): 957-965.
- Matias I, Buosi AS, Gomes FC (2016). Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. *Neurochem. Int.* 95: 85-91.
- Mazella J (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal.* 13(1): 1-6.
- McCuen-Wurst C, Ruggieri M, Allison KC (2017). Disordered eating and obesity: associations between binge-eating disorder, night-eating syndrome, and weight-related comorbidities. *Ann. NY Acad. Sci.*
- McNab F, Varrone A, Farde L, Jucaite A, Bystritsky P, Forssberg H, Klingberg T (2009). Changes in cortical dopamine D1 receptor binding associated with cognitive training. *Science* 323(5915): 800-2.

- McNeilly AD, Gallagher JR, Dinkova-Kostova AT, Hayes JD, Sharkey J, Ashford ML, McCrimmon RJ (2016). Nrf2-Mediated Neuroprotection Against Recurrent Hypoglycemia Is Insufficient to Prevent Cognitive Impairment in a Rodent Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes* 65(10): 3151-60.
- Meek TH, Matsen ME, Dorfman MD, Guyenet SJ, Damian V, Nguyen HT, Taborsky GJ Jr, Morton GJ (2013). Leptin action in the ventromedial hypothalamic nucleus is sufficient, but not necessary, to normalize diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 154(9): 3067-76.
- Mercer RE, Chee MJ, Colmers WF (2011). The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Front. Neuroendocrinol.* 32: 398-415.
- Messina G, Valenzano A, Moscatelli F, Salerno M, Lonigro A, Esposito T, Monda V, Corso G, Messina A, Viggiano A, Triggiani AI, Chieffi S, Guglielmi G, Monda M, Cibelli G (2017). Role of Autonomic Nervous System and Orexinergic System on Adipose Tissue. *Front. Physiol.* 8: 137.
- Miller AA, Spencer SJ (2014). Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav. Immun.* 42: 10-21.
- Mizutani K *et al* (2000). Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 18(12): 1833-1840.
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gomez-Pinilla F (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 112: 803-814.
- Moosavi F *et al* (2016). Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug design, development and therapy* 10: 23.
- Morinville A, Martin S, Lavallée M, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J (2004). Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(11): 2153-68.
- Morris G, Anderson G, Maes M (2016). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Hypofunction in Myalgic Encephalomyelitis (ME)/Chronic Fatigue Syndrome (CFS) as a Consequence of Activated Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Pathways. *Mol. Neurobiol.*
- Morshedzadeh N, Rahimlou M, Asadzadeh Aghdai H, Shahrokh S, Reza Zali M, Mirmiran P (2017). Association Between Adipokines Levels with Inflammatory Bowel Disease (IBD): *Systematic Reviews Dig. Dis. Sci.* 62(12): 3280-3286.
- Morton GJ, Cummings, DE, Baskin, DG, Barsh, GS and Schwartz, MW (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289-295.
- Mosquera L, Colón JM, Santiago JM, Torrado AI, Meléndez M, Segarra AC, Rodríguez-Orengo JF, Miranda JD (2014). Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha. *Brain Res.* 1561: 11-22.
- Moura LI, Silva L, Leal EC, Tellechea A, Cruz MT, Carvalho E (2013). Neurotensin modulates the migratory and inflammatory response of macrophages under hyperglycemic conditions. *Biomed. Res. Int.* 2013: 941764.
- Müller L, Fritzsche P, Weinert D (2015). Novel object recognition of Djungarian hamsters depends on circadian time and rhythmic phenotype. *Chronobiol. Int.* 32: 458-67.
- Müller MJ, Enderle J, Bosy-Westphal A (2016). Changes in Energy Expenditure with Weight Gain and Weight Loss in Humans. *Curr. Obes. Rep.* 5(4): 413-423.

- Münzberg H, Flier JS and Bjørbaek C (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145: 4880-4889.
- Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, Kaplitt MG, Ogawa S (2007). Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(7): 2501-6.
- Mykkänen OT, Huotari A, Herzig KH, Dunlop TW, Mykkänen H, Kirjavainen PV (2014). Wild blueberries (*Vaccinium myrtillus*) alleviate inflammation and hypertension associated with developing obesity in mice fed with a high-fat diet. *PLoS One* 9(12): e114790.
- Najimi M, Robert JJ, Mallet J, Rostène W, Forgez P (2002). Neurotensin induces tyrosine hydroxylase gene activation through nitric oxide and protein kinase C signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* 62(3): 647-53.
- Nakao K, Ikegaya Y, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N (2002). Hippocampal long-term depression as an index of spatial working memory. *Eur. J. Neurosci.* 16(5): 970-4.
- Nalund E, Schmidt PT, Hellstrom PM (2005). Gut peptides hormones: importance for food intake. *Scand. J. Gastroenterol.* 40: 250-258.
- Nascimento JO, Zangrossi H Jr, Viana MB (2010). Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43(9): 869-73.
- Nascimento JO, Kikuchi LS, de Bortoli VC, Zangrossi H Jr, Viana MB (2014). Dorsomedial hypothalamus serotonin 1A receptors mediate a panic-related response in the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.* 109: 39-45.
- Navarro V, Martin S, Sarret P, Nielsen MS, Petersen CM, Vincent J, Mazella J (2001). Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett.* 495(1-2): 100-5.
- Neese SL, Pisani SL, Doerge DR, Helferich WG, Sepehr E, Chittiboyina AG, Rotte SC, Smillie TJ, Khan IA, Korol DL, Schantz SL (2014). The effects of dietary treatment with S-equol on learning and memory processes in middle-aged ovariectomized rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 41: 80-8.
- Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, Kim JK, Czech MP (2014). IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One* 9(9): e107265.
- Nishimura Y, Mabuchi K, Takano A, Hara Y, Negishi H, Morimoto K, Ueno T, Uchiyama S, Takamata A (2017). S-equol Exerts Estradiol-Like Anorectic Action with Minimal Stimulation of Estrogen Receptor- $\alpha$  in Ovariectomized Rats. *Front. Endocrinol.* 8: 281.
- Nixon JP, Smale L (2007). A comparative analysis of the distribution of immunoreactive orexin A and B in the brains of nocturnal and diurnal rodents. *Behav. Brain Funct.* 3: 28.
- Nixon JP, Kotz CM, Novak CM, Billington CJ, Teske JA (2012). Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins. *Handb. Exp. Pharmacol.* 209: 77-109.
- Normandeau CP, Ventura-Silva AP, Hawken ER, Angelis S, Sjaarda C, Liu X, Pêgo JM, Dumont ÉC (2018). A Key Role for Neurotensin in Chronic-Stress-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology.* 43(2):285-293.
- Norris GH, Blesso CN (2017). Dietary sphingolipids: potential for management of dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr. Rev.* 75(4): 274-285.



- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* 18(8): 1859-75.
- O'Rahilly S, Farooqi IS (2008). Human obesity: a heritable neurobehavioral disorder that is highly sensitive to environmental conditions. *Diabetes* 57: 2905-2910.
- Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, Palumbo DR, Pino A, De Pasquale R, Circosta C (2008). The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. *Phytomedicine* 15(9): 676-82.
- Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA* 311(8): 806-14.
- Ohinata K, Sonoda S, Inoue N, Yamauchi R, Wada K, Yoshikawa M (2007). beta-Lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine beta-lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice. *Peptides* 28(7): 1470-4.
- Ollmann T, Péczely L, László K, Kovács A, Gálosi R, Kertes E, Kállai V, Zagorác O, Karádi Z, Lénárd L (2015). Anxiolytic effect of neurotensin microinjection into the ventral pallidum. *Behav. Brain Res.* 294: 208-14.
- Opland D, Sutton A, Woodworth H, Brown J, Bugescu R, Garcia A, Christensen L, Rhodes C, Myers M Jr, Leininger G (2013). Loss of neurotensin receptor-1 disrupts the control of the mesolimbic dopamine system by leptin and promotes hedonic feeding and obesity. *Mol. Metab.* 2(4): 423-34.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29: 71-109.
- Panee J (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* 60(1): 1-12.
- Park MH, Ju JW, Kim M, Han JS (2016). The protective effect of daidzein on high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Z. Naturforsch. C.* 71(1-2): 21-8.
- Park YJ, Ko JW, Jeon S, Kwon YH (2016). Protective Effect of Genistein against Neuronal Degeneration in ApoE(-/-) Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* 8(11).
- Patel AB, Tsilioni I, Leeman SE, Theoharides TC (2016). Neurotensin stimulates sortilin and mTOR in human microglia inhibitable by methoxyluteolin, a potential therapeutic target for autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
- Patisaul HB, Sullivan AW, Radford ME, Walker DM, Adewale HB, Winnik B, Coughlin JL, Buckley B, Gore AC (2012). Anxiogenic effects of developmental bisphenol A exposure are associated with gene expression changes in the juvenile rat amygdala and mitigated by soy. *PLoS One* 7(9): e43890.
- Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.* 20(9): 1996-2009.
- Pelaprat D (2006). Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides* 27(10): 2476-87.
- Peña-Altamira E, Petralla S, Massenzio F, Virgili M, Bolognesi ML, Monti B (2017). Nutritional and Pharmacological Strategies to Regulate Microglial Polarization in Cognitive Aging and Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 9: 175.

- Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM (2010). Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry* 67(9): 880-6.
- Petrie KA, Bubser M, Casey CD, Davis MD, Roth BL, Deutch AY (2004). The neurotensin agonist PD149163 increases Fos expression in the prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 29(10): 1878-88.
- Piatek J, Witmanowski H, Paluszak J, Krauss H, Krawczyk J (2005). The effects of neurotensin on selected parameters of lipid metabolism in rats. *Peptides* 26(5): 837-43.
- Piccart E, Courtney NA, Branch SY, Ford CP, Beckstead MJ (2015). Neurotensin Induces Presynaptic Depression of D2 Dopamine Autoreceptor-Mediated Neurotransmission in Midbrain Dopaminergic Neurons. *J. Neurosci.* 35(31): 11144-52.
- Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al (2010). Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J. Neuroimmunol.* 219: 25-32.
- Ponti G, Rodriguez-Gomez A, Farinetti A, Marraudino M, Filice F, Foglio B, Sciacca G, Panzica GC, Gotti S (2017). Early postnatal genistein administration permanently affects nitrenergic and vasopressinergic systems in a sex-specific way. *Neuroscience* 346: 203-215.
- Prasad R, Venkatasubramanian J, Amde M, Rao MC (2004). Phospholipase C and src tyrosine kinases mediate neurotensin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion in rabbit proximal colon. *Dig. Dis. Sci.* 49(7-8): 1318-26.
- Pratchayasakul W, Kerdphoo S, Petsophonsakul P, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2011). Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. *Life Sci.* 88(13-14): 619-27.
- Qu Y, Zhang Q, Ma S, Liu S, Chen Z, Mo Z, You Z (2016). Interleukin-17<sup>o</sup> Differentially Induces Inflammatory and Metabolic Gene Expression in the Adipose Tissues of Lean and Obese Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 17(4): 522.
- Ratner C, Skov LJ, Raida Z, Bächler T, Bellmann-Sickert K, Le Foll C, Sivertsen B, Dalbøge LS, Hartmann B, Beck-Sickinger AG, Madsen AN, Jelsing J, Holst JJ, Lutz TA, Andrews ZB, Holst B (2016). Effects of Peripheral Neurotensin on Appetite Regulation and Its Role in Gastric Bypass Surgery. *Endocrinology* 157(9): 3482-92.
- Rebolledo-Solleiro D, Roldán-Roldán G, Díaz D, Velasco M, Larqué C, Rico-Rosillo G, Vega-Robledo GB, Zambrano E, Hiriart M, Pérez de la Mora M (2017). Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. *PLoS One* 12(5): e0176554.
- Redinger RN (2007). The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterol Hepatol.* 3(11): 856-63.
- Rehfeldt JF (2004). Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 18: 569-586.
- Richard F, Barroso S, Martinez J, Labbé-Jullié C, Kitabgi P (2001). Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol. Pharmacol.* 60(6): 1392-8.
- Rivera P, Pérez-Martín M, Pavón FJ, Serrano A, Crespillo A, Cifuentes M, López-Ávalos MD, Grondona JM, Vida M, Fernández-Llebrez P, de Fonseca FR, Suárez J (2013). Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One* 8(5): e64750.

- Roberts RE, Deleger S, Strawbridge WJ, Kaplan GA (2003). Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 514-21.
- Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int. J. Endocrinol.* 2013: 678159.
- Rogacka D, Audzeyenka I, Rychłowski M, Rachubik P, Szrejder M, Angielski S, Piwkowska A (2017). Metformin overcomes high glucose-induced insulin resistance of podocytes by pleiotropic effects on SIRT1 and AMPK. *Biochim. Biophys. Acta.* 1864(1): 115-125.
- Rose SA, Poynter PS, Anderson JW, Noar SM, Conigliaro J (2013). Physician weight loss advice and patient weight loss behavior change: a literature review and meta-analysis of survey data. *Int. J. Obes.* 37: 118-28.
- Rosenbaum M, Goldsmith R, Bloomfield D, Magnano A, Weimer L, Heymsfield S, Gallagher D, Mayer L, Murphy E, Leibel RL (2005). Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J. Clin. Invest.* 115: 3579-3586.
- Rosmaninho-Salgado J, Cortez V, Estrada M, Santana MM, Gonçalves A, Marques AP, Cavadas C (2012). Intracellular mechanisms coupled to NPY Y2 and Y5 receptor activation and lipid accumulation in murine adipocytes. *Neuropeptides* 46(6): 359-66.
- Rowe WB, Kar S, Meaney MJ, Quirion R (2006). Neurotensin receptor levels as a function of brain aging and cognitive performance in the Morris water maze task in the rat. *Peptides* 27(10): 2415-23.
- Rubenstein JH, Morgenstern H, McConell D, Scheiman JM, Schoenfeld P, Appelman H, McMahon LF Jr, Kao JY, Metko V, Zhang M, Inadomi JM (2013). Associations of diabetes mellitus, insulin, leptin, and ghrelin with gastroesophageal reflux and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 145(6): 1237-44.
- Russell JC, Proctor SD (2006). Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.* 15: 318-30.
- Sah N, Peterson BD, Lubejko ST, Vivar C, van Praag H (2017). Running reorganizes the circuitry of one-week-old adult-born hippocampal neurons. *Sci. Rep.* 7(1): 10903.
- Sahu A, Carraway RE, Wang YP (2001). Evidence that neurotensin mediates the central effect of leptin on food intake in rat. *Brain Res.* 888(2): 343-347.
- Sakamoto Y, Kanatsu J, Toh M, Naka A, Kondo K, Iida K (2016). The Dietary Isoflavone Daidzein Reduces Expression of Pro-Inflammatory Genes through PPAR $\alpha$ / $\gamma$  and JNK Pathways in Adipocyte and Macrophage Co-Cultures. *PLoS One* 11(2): e0149676.
- Santini A, Novellino E (2017). Nutraceuticals in hypercholesterolaemia: an overview. *Br. J. Pharmacol.* 174(11): 1450-1463.
- Sarafoglou K, Forlenza GP, Yaw Addo O, Kylo J, Lteif A, Hindmarsh PC, Petryk A, Gonzalez-Bolanos MT, Miller BS, Thomas W (2017). Obesity in children with congenital adrenal hyperplasia in the Minnesota cohort: importance of adjusting body mass index for height-age. *Clin. Endocrinol.* 86(5): 708-716.
- Sarfert KS, Knabe ML, Gunawansa NS, Blythe SN (2017). Western-style diet induces object recognition deficits and alters complexity of dendritic arborization in the hippocampus and entorhinal cortex of male rats. *Nutr. Neurosci.* 17: 1-10.

- Sarret P, Gendron L, Kilian P, Nguyen HM, Gallo-Payet N, Payet MD, Beaudet A (2002). Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 277(39): 36233-43.
- Sarret P, Krzywkowski P, Segal L, Nielsen MS, Petersen CM, Mazella J, Stroh T, Beaudet A (2003). Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 461(4): 483-505.
- Sasaki A, de Vega W, Sivanathan S, St-Cyr S, McGowan PO (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience* 272: 92-101.
- Scarpace PJ, Matheny M, Kirichenko N, Gao YX, Tümer N, Zhang Y (2013). Leptin overexpression in VTA trans-activates the hypothalamus whereas prolonged leptin action in either region cross-desensitizes. *Neuropharmacology* 65: 90-100.
- Schimpff RM, Avard C, Fénelon G, Lhiaubet AM, Tennezé L, Vidailhet M, Rostène W (2001). Increased plasma neurotensin concentrations in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70(6): 784-6.
- Schmandt RE, Iglesias DA, Co NN, Lu KH (2011). Understanding Obesity and Endometrial Cancer Risk: Opportunities for prevention. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 205: 518-525.
- Segula D (2014). Complications of obesity in adults: a short review of the literature. *Malawi Med. J.* 26(1): 20-4.
- Serra MC, Ryan AS, Sorkin JD, Favor KH, Goldberg AP (2015). High adipose LPL activity and adipocyte hypertrophy reduce visceral fat and metabolic risk in obese, older women. *Obesity (Silver Spring)* 23(3): 602-7.
- Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E (2002). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* 132(12): 3577-84.
- Setchell KD, Brown NM, Desai PB, Zimmer-Nechimias L, Wolfe B, Jakate AS, et al (2003). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J. Nutr.* 133(4): 1027-1035.
- Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ, Heubi JE (2005). S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(5): 1072-9.
- Sharma C (2015). Oestrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Global Journal of Multidisciplinary Studies* 4(2).
- Sharma HR, Thakur MK (2015). Correlation of ER $\alpha$ /ER $\beta$  expression with dendritic and behavioural changes in CUMS mice. *Physiol. Behav.* 145: 71-83.
- Shi H, Sorrell JE, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ (2010). The roles of leptin receptors on POMC neurons in the regulation of sex-specific energy homeostasis. *Physiol. Behav.* 100: 165-172.
- Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, Muise AM, Snapper SB (2014). Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv Immunol.* 122: 177-210.
- Shugalev NP, Stavrovskaja AV, Iamshchikova NG (2005). [Effect of neurotensin on the behavior of rats with damaged serotonergic neurons under immobilization stress]. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova.* 55(5):

671-6.

Simental-Mendía LE, Gotto AM Jr, Atkin SL, Banach M, Pirro M, Sahebkar A (2017). Effect of soy isoflavone supplementation on plasma lipoprotein(a) concentrations: A meta-analysis. *J. Clin. Lipidol.*

Singh M (2014). Mood, food, and obesity. *Front. Psychol.* 5: 925.

Sobrino Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jiménez L, Barrios V, Arilla Ferreiro E (2014). Peptides and food intake. *Front. Endocrinol. Lausanne.* 5: 58.

Solas M, Milagro FI, Ramírez MJ, Martínez JA (2017). Inflammation and gut-brain axis link obesity to cognitive dysfunction: plausible pharmacological interventions. *Curr. Opin. Pharmacol.* 37: 87-92.

Solfrizzi V, Panza F, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, Pilotto A (2011). Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence. *Expert. Rev. Neurother.* 11(5): 677-708.

Soukup ST, Helppi J, Müller DR, Zierau O, Watzl B, Vollmer G, Diel P, Bub A, Kulling SE (2016). Phase II metabolism of the soy isoflavones genistein and daidzein in humans, rats and mice: a cross-species and sex comparison. *Arch. Toxicol.* 90(6): 1335-47.

Spencer SP, Ganeshalingam S, Kelly S, Ahmad M (2012). The role of ultrasound in the diagnosis and follow-up of early inflammatory arthritis. *Clin. Radiol.* 67(1): 15-23.

Srivastava RA (2000). He S. Anti-hyperlipidemic and insulin sensitizing activities of fenofibrate reduces aortic lipid deposition in hyperlipidemic Golden Syrian hamster. *Mol. Cell. Biochem.* 345: 197-206.

St-Gelais F, Jomphe C, Trudeau LE (2006). The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J. Psychiatry Neurosci.* 31(4): 229-45.

Steinert RE, Ullrich SS, Geary N, Asarian L, Bueter M, Horowitz M, Feinle-Bisset C (2017). Comparative effects of intraduodenal amino acid infusions on food intake and gut hormone release in healthy males. *Physiol. Rep.* 5(21).

Sternson SM (2013). Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. *Neuron* 77(5): 810-24.

Stillman CM, Weinstein AM, Marsland AL, Gianaros PJ, Erickson KI (2017). Body-Brain Connections: The Effects of Obesity and Behavioral Interventions on Neurocognitive Aging. *Front. Aging Neurosci.* 9: 115.

Strigo IA, Murray SB, Simmons AN, Bernard RS, Huang JS, Kaye WH (2017). The clinical application of fMRI data in a single-patient diagnostic conundrum: Classifying brain response to experimental pain to distinguish between gastrointestinal, depressive and eating disorder symptoms. *J. Clin. Neurosci.* 45: 149-153.

Subedi L, Ji E, Shin D, Jin J, Yeo JH, Kim SY (2017). Equol, a Dietary Daidzein Gut Metabolite Attenuates Microglial Activation and Potentiates Neuroprotection In vitro. *Nutrients* 9(3).

Sun J, Gao Y, Yao T, Huang Y, He Z, Kong X, Yu KJ, Wang RT, Guo H, Yan J, Chang Y, Chen H, Scherer PE, Liu T, Williams KW (2016). Adiponectin potentiates the acute effects of leptin in arcuate Pomc neurons. *Mol. Metab.* 5(10): 882-91.

Swanson D, Block R, Mousa SA (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr.* 3(1): 1-7.

Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN (2012). Association of TNF- $\alpha$  with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Med. Res.* 135: 127-30.

- Swinburn B, Sacks G, Ravussin E (2009). Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 90(6): 1453-6.
- Takeda S, Sato N, Morishita R (2014). Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front. Aging Neurosci.* 6:171.
- Tang Y, Ho G, Li Y, Hall MA, Hills RL, Black SC, Liang Y, Demarest KT (2012). Beneficial metabolic effects of CB1R anti-sense oligonucleotide treatment in diet-induced obese AKR/J mice. *PLoS One* 7(8): e42134.
- Tang C, Zhang K, Zhao Q, Zhang J (2015). Effects of Dietary Genistein on Plasma and Liver Lipids, Hepatic Gene Expression, and Plasma Metabolic Profiles of Hamsters with Diet-Induced Hyperlipidemia. *J. Agric. Food Chem.* 63(36): 7929-36.
- Teitelbaum P, Stellar E (1954). Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions. *Science* 120(3126): 894-5.
- Thaler JP, Yi C, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, et al (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation* 122: 153-162.
- Theoharides TC (2017). Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol.* 26(9): 751-759.
- Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC (1995). Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N. Engl. J. Med.* 332(10): 635-41.
- Tirado-Santiago G, Lázaro-Muñoz G, Rodríguez-González V, Maldonado-Vlaar CS (2006). Microinfusions of neurotensin antagonist SR 48692 within the nucleus accumbens core impair spatial learning in rats. *Behav. Neurosci.* 120(5): 1093-102
- Toita R, Kawano T, Murata M, Kang JH (2016). Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice. *Biomaterials* 110: 81-88.
- Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat. Neurosci.* 11: 998-1000.
- Trojova I, Kozarova M, Petrasova D, Malachovska Z, Paranicova I, Joppa P, Tkacova R (2017). Circulating lipopolysaccharide-binding protein and carotid intima-media thickness in obstructive sleep apnea. *Physiol. Res.*
- Tschöp MH, Schwartz MW (2011). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 122: 778.
- Tsutsumi K, Hagi A, Inoue Y (2001). The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 579-81.
- Tulloch AJ, Murray S, Vaicekonyte R, Avena NM (2015). Neural responses to macronutrients: hedonic and homeostatic mechanisms. *Gastroenterology* 148(6): 1205-18.

- Türközü D and Tek NA (2017). A minireview of effects of green tea on energy expenditure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57(2): 254-258.
- Turner JV, S Agatonovic-Kustrin, BD Glass (2007). Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *Journal of pharmaceutical sciences.* 96(8): 1879-1885.
- Tyler-McMahon BM, Stewart JA, Farinas F, McCormick DJ, Richelson E (2000). Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 390(1-2): 107-11.
- Vadnie CA, Hinton DJ, Choi S, Choi Y, Ruby CL, Oliveros A, Prieto ML, Park JH, Choi DS (2014). Activation of neurotensin receptor type 1 attenuates locomotor activity. *Neuropharmacology* 85: 482-92.
- Valladolid-Acebes I, Fole A, Martín M, Morales L, Cano MV, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N (2013). Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin? *Neurobiol Learn Mem.* 106: 18-25.
- Van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, Jo YH, MacKenzie RG, Allison DB, Dun NJ, Elmquist J, Lowell BB, Barsh GS, de Luca C, Myers MG, Jr, Schwartz GJ, Chua SC., Jr (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* 149: 1773-1785.
- Van der Plasse G, Van Zessen R, Luijendijk MC, Erkan H, Stuber GD, Ramakers GM, Adan RA (2015). Modulation of cue-induced firing of ventral tegmental area dopamine neurons by leptin and ghrelin. *Int. J. Obes. Lond.* 39(12): 1742-9.
- Van der Velpen V, Geelen A, Hollman PC, Schouten EG, van 't Veer P, Afman LA (2014). Isoflavone supplement composition and equol producer status affect gene expression in adipose tissue: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 100(5): 1269-1277.
- Van Goethem NP, Rutten K, van der Staay FJ, et al., (2012). Object recognition testing: Rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behav. Brain Res.* 232: 323-34.
- Van Swieten MM, Pandit R, Adan RA, van der Plasse G (2014). The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 61-62: 207-20.
- Veronese N, Facchini S, Stubbs B, Luchini C, Solmi M, Manzato E, Sergi G, Maggi S, Cosco T, Fontana L (2017). Weight loss is associated with improvements in cognitive function among overweight and obese people: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 72: 87-94.
- Villeneuve P, Feliciangeli S, Croissandeau G, Seidah NG, Mbikay M, Kitabgi P, Beaudet A (2002). Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J. Neurochem.* 82(4): 783-93.
- Volkow ND, Wang GJ, Baler RD (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* 15(1): 37-46.
- Vong LYC, Yang Z, Choi B, Chua Js and Lowell BB (2011). Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron.* 71: 142-154.
- Voyer D, Lévesque D, Rompré PP (2017). Repeated ventral midbrain neurotensin injections sensitize to amphetamine-induced locomotion and ERK activation: A role for NMDA receptors. *Neuropharmacology* 112(Pt A): 150-163.

- Waisman A, Hauptmann J, Regen T (2015). The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol.* 129(5): 625-37.
- Wang CQF, Akalu YT, Suarez-Farinas M, Gonzalez J, Mitsui H, Lowes MA, Orlow SJ, Manga P, Krueger JG (2013). IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: potential relevance to psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 133(12): 2741-2752.
- Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ (2014). Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 10(2): 131-45.
- Wang TY, Yu CC, Hsieh PL, Liao YW, Yu CH, Chou MY (2017). GMI ablates cancer stemness and cisplatin resistance in oral carcinomas stem cells through IL-6/Stat3 signaling inhibition. *Oncotarget* 8(41): 70422-70430.
- Wasin M (2015). Role of Leptin in Obesity. *J. Obes. Weight Loss Ther.* 5: 258.
- Watt MJ, Carey AL, Wolsk-Petersen E, Kraemer FB, Pedersen BK, Febbraio MA (2005). Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion. *Diabetologia* 48: 105-12.
- Wellen KE and Hotamisligil GS (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115: 1111-9.
- White JF, Noinaj N, Shibata Y, Love J, Kloss B, Xu F, Gvozdenovic-Jeremic J, Shah P, Shiloach J, Tate CG, Grishammer R (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature* 490(7421): 508-13.
- Wierucka-Rybak M, Wolak M, Juszczak M, Drobnik J, Bojanowska E (2016). The inhibitory effect of combination treatment with leptin and cannabinoid CB1 receptor agonist on food intake and body weight gain is mediated by serotonin 1B and 2C receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 67(3): 457-63.
- Wolfson B, Zhang Y, Gernapudi R, Duru N, Yao Y, Lo PK, Zhou Q (2017). A High-Fat Diet Promotes Mammary Gland Myofibroblast Differentiation through MicroRNA 140 Downregulation. *Mol. Cell Biol.* 37(4).
- Woo J., Yu R., Yau F (2013). Fitness, fatness and survival in elderly populations. *Age* 35, 973-984. doi:10.1007/s11357-012-9398-6.
- Woods S and D'Alessio D (2008). Central control of body weight and appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93(11 Suppl 1): S37-50.
- Woodworth HL, Batchelor HM, Beekly BG, Bugescu R, Brown JA, Kurt G, Fuller PM, Leininger GM (2017). Neurotensin Receptor-1 Identifies a Subset of Ventral Tegmental Dopamine Neurons that Coordinates Energy Balance. *Cell Rep.* 20(8): 1881-1892.
- Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD (2009). Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell* 137: 1225-1234.
- Wu Q and Palmiter, RD (2011). GABAergic signaling by AgRP neurons prevents anorexia via a melanocortin-independent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 660: 21-27.
- Wu Y, Yu Y, Szabo A, Han M, Huang XF (2014). Central inflammation and leptin resistance are attenuated by ginsenoside Rb1 treatment in obese mice fed a high-fat diet. *PLoS One* 9(3): e92618.
- Xiao Z, Cilz NI, Kurada L, Hu B, Yang C, Wada E, Combs CK, Porter JE, Lesage F, Lei S (2014). Activation of neurotensin receptor 1 facilitates neuronal excitability and spatial learning and memory in the entorhinal cortex: beneficial actions in an Alzheimer's disease model. *J. Neurosci.* 34(20): 7027-42.



- Xiao BX *et al* (2016). Pharmacokinetic profiles of the five isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots in the CSF and plasma of rats. *Journal of ethnopharmacology* 184: 22-29.
- Xu P, Cao X, He Y, Zhu L, Yang Y, Saito K, Wang C, Yan X, Hinton AO Jr, Zou F, Ding H, Xia Y, Yan C, Shu G, Wu SP, Yang B, Feng Y, Clegg DJ, DeMarchi R, Khan SA, Tsai SY, DeMayo FJ, Wu Q, Tong Q, Xu Y (2015). Estrogen receptor- $\alpha$  in medial amygdala neurons regulates body weight. *J. Clin. Invest.* 125(7): 2861-76.
- Xu Y, Li Z, Yin Y, Lan H, Wang J, Zhao J, Feng J, Li Y, Zhang W (2015). Ghrelin inhibits the differentiation of T helper 17 cells through mTOR/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* 10(2): e0117081.
- Xue TF, Ding X, Ji J, Yan H, Huang JY, Guo XD, Yang J, Sun XL (2017). PD149163 induces hypothermia to protect against brain injury in acute cerebral ischemic rats. *J. Pharmacol. Sci.*
- Yam KY, Ruigrok SR, Ziko I, De Luca SN, Lucassen PJ, Spencer SJ, Korosi A (2017). Ghrelin and hypothalamic NPY/AgRP expression in mice are affected by chronic early-life stress exposure in a sex-specific manner. *Psychoneuroendocrinology* 86: 73-77.
- Yamada J, Hatabe J, Tankyo K, Jinno S (2016). Cell type- and region-specific enhancement of adult hippocampal neurogenesis by daidzein in middle-aged female mice. *Neuropharmacology* 111: 92-106.
- Yamauchi R, Wada E, Kamichi S, Yamada D, Maeno H, Delawary M, Nakazawa T, Yamamoto T, Wada K (2007). Neurotensin type 2 receptor is involved in fear memory in mice. *J. Neurochem.* 102(5): 1669-76.
- Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X (2008). Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J.* 22: 2452-64.
- Ye Y, Liu P, Wang Y, Li H, Wei F, Cheng Y, Han L, Yu J (2016). Neurotensin, a Novel Messenger to Cross-Link Inflammation and Tumor Invasion via Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway. *Int. Rev. Immunol.* 35(4): 340-350.
- Yu C, Tai F, Wu R, Song Z, Zhang X, An X (2010). Maternal exposure to daidzein alters behaviour and oestrogen receptor alpha expression in adult female offspring. *Behav. Pharmacol.* 21(4): 283-91.
- Yu C, Tai F, Zeng S, Zhang X (2013). Effects of perinatal daidzein exposure on subsequent behavior and central estrogen receptor  $\alpha$  expression in the adult male mouse. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 43: 157-67.
- Zahm DS, Grosu S, Williams EA, Qin S, Bérød A (2001). Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* 104(3): 841-51.
- Zeng S, Tai F, Zhai P, Yuan A, Jia R, Zhang X (2010). Effect of daidzein on anxiety, social behavior and spatial learning in male Balb/cJ mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96(1): 16-23.
- Zhang R, Guo HN, Wu HQ, Cheng HX, Wang HQ (2011). [Effect of puerarin on the expression of NMDA receptor in the hippocampus CA1 region after focal cerebral ischemia in rats]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 42(1): 52-5.
- Zhang L, Dasuri K, Fernandez-Kim SO, Bruce-Keller AJ, Freeman LR, Pepping JK, Beckett TL, Murphy MP, Keller JN (2013). Prolonged diet induced obesity has minimal effects towards brain pathology in mouse model of cerebral amyloid angiopathy: implications for studying obesity-brain interactions in mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1832(9): 1456-62.

- Zhang Y, Wang J, Sun X, Cao Z, Xu X, Liu D, Xin X, Qin M (2015). Laparoscopic sleeve gastrectomy versus laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity and related comorbidities: a meta-analysis of 21 studies. *Obes Surg.* 25(1): 19-26.
- Zhang G, Wang K, Li XD, Zhang DL, Xu F (2016). Discovery of novel antagonists of human neurotensin receptor 1 on the basis of ligand and protein structure. *Biomed. Pharmacother.* 84: 147-157.
- Zhang YB *et al* (2016). Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: A Sensitive Method for the Determination of Dehydrodiisoeugenol in Rat Cerebral Nuclei. *Molecules* 21(3): 321.
- Zhang HF, Wu MX, Lin YQ, Xie SL, Huang TC, Liu PM, Nie RQ, Meng QQ, Luo NS, Chen YX, Wang JF (2017). IL-33 promotes IL-10 production in macrophages: a role for IL-33 in macrophage foam cell formation. *Exp. Mol. Med.* 49(11): e 388.
- Zheng LH, Wu LM, Yao Y, Chen WS, Bao JR, Huang W, Shi R, Zhang KJ, Zhang S (2014). Impact of body mass index on plasma N-terminal ProB-type natriuretic peptides in Chinese atrial fibrillation patients without heart failure. *PLoS One* 9(8):e105249.
- Zheng J, Zhao M, Li J, Lou G, Yuan Y, Bu S, Xi Y (2017). Obesity-associated digestive cancers: A review of mechanisms and interventions. *Tumour Biol.* 39(3): 1010428317695020.
- Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2002). Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol. Behav.* 77(2-3): 251-7.
- Zigmond E, Bernshtein B, Friedlander G, Walker CR, Yona S, Kim KW, Brenner O, Krauthgamer R, Varol C, Müller W, Jung S (2014). Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 40(5): 720-33.
- Ziko I, De Luca S, Dinan T, Barwood JM, Sominsky L, Cai G, Kenny R, Stokes L, Jenkins TA, Spencer SJ (2014). Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. *Brain Behav. Immun.* 41: 32-43.
- Zúñiga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, Andrade SM, Cua DJ, Kraemer FB, Butcher EC (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J. Immunol.* 185(11): 6947-59.

# ABBREVIAZIONI

**ACS:** Aminio Cupric Silver Stain  
**AD:** Alzheimer's disease  
**AgRP:** Agouti related protein  
**AMY:** Amigdala  
**ARC:** Nucleo arcuato  
**BBB:** Barriera ematoencefalica  
**BDNF:** Brain-derived neurotrophic factor  
**BMI:** Indice di massa corporea  
**CART:** Cocaine-amphetamine regulated transcript  
**CHR:** Corticotropina  
**CKK:** Colecistochinina  
**COR:** Corteccia  
**COX-2:** Ciclooossigenasi 2  
**CPP:** Conditioned place preference  
**CREB:** cAMP response element-binding protein  
**CRP:** Proteina C reattiva  
**CTRL:** Controllo  
**DA:** Dopamina  
**DI:** Indice di discriminazione  
**DIO:** Obesità indotta dalla dieta  
**DMH:** Ipotalamo dorsomediale  
**DZ:** Daidzein  
**EPM:** Elevated plus maze  
**ER:** Recettori estrogenici  
**FFAs:** Acidi grassi liberi in eccesso  
**GABA:** Acido  $\gamma$ -amminobutirrico  
**HFD:** High fat diet  
**HIP:** Ippocampo  
**HTH:** Ipotalamo  
**IL-1,10,17A:** Interleuchina-1,10,17A  
**JNK:** c-Jun N-terminal kinases  
**KO:** Knock-out  
**LHA:** Nucleo dell'ipotalamo laterale  
**MAP** Proteine chinasi attivate da mitogeno

**MC4R:** Recettore 4 della melanocortina  
**mPFC:** Corteccia prefrontale mediale  
**NFkB:** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
**NMDA:** Recettore N-metil-D-aspartato  
**NN:** Neuromedina  
**NOR:** Novel object recognition  
**NPY:** Neuropeptide Y  
**NT:** Neurotensina  
**NTR1-2-3-4:** Recettori 1-2-3-4 della neurotensina  
**NTS:** Nucleo del tratto solitario  
**ORXA-B:** Orexina A-B  
**PD:** Parkinson's Disease  
**PKC:** Proteina chinasi C  
**POMC:** Neuroni che esprimono la proopiomelanocortina  
**PVN:** Nucleo paraventricolare  
**PYY:** Peptide YY  
**SCAT:** Tessuto adiposo sottocutaneo  
**SNC:** Sistema Nervoso Centrale  
**TC:** Colesterolo totale  
**TGF-  $\beta$ :** Tissue growth factor- $\beta$   
**TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis alfa  
**TRIG:** Trigliceridi  
**VAT:** Tessuto adiposo sottoviscerale  
**VCAM:** Vascular cell adhesion protein  
**VMN:** Nucleo ventromediale  
**VP:** Pallido ventrale  
**VTA:** Area tegmentale ventrale  
**WHO:** World Health Organization  
**WM:** Working memory  
 **$\alpha$ -MSH:**  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone