



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

Ciclo XXXI

**MODELLO SPERIMENTALE DI ANORESSIA NERVOSA
“ACTIVITY-BASED ANOREXIA”:
MODIFICAZIONI EPIGENETICHE DEL SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE, ALTERAZIONI DEI LIVELLI DELLE
MONOAMINE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE
E DEGLI ACIDI GRASSI NEL PLASMA.**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14-Farmacologia

Presentata da:

Dott.ssa Elisa Giunti

Coordinatore Dottorato:

Prof. Antonio Argiolas

Tutor:

Prof.ssa Paola Fadda

Esame finale anno accademico 2017 – 2018
Tesi discussa nella sessione d’esame Gennaio-Febbraio 2019

1 Sommario

Capitolo 1. Introduzione.....	1
1.1 Il comportamento alimentare.....	1
1.1.1 La regolazione omeostatica del comportamento alimentare	1
1.1.2 La regolazione edonica dell'assunzione di cibo	5
1.2 Disturbi del comportamento alimentare	8
1.3 Anoressia Nervosa.....	9
1.3.1 Definizione e classificazione	9
1.3.2 Epidemiologia	10
1.3.3 Caratteristiche e complicanze mediche legate all'AN.....	12
1.4 Neurobiologia dell'anoressia nervosa	17
1.4.1 Il Sistema dopaminergico	23
1.4.2 Ruolo del sistema dopaminergico nella regolazione del comportamento alimentare ...	26
1.4.3 Ruolo del sistema dopaminergico nella patologia dell'AN.....	27
1.4.4 Il sistema endocannabinoide.....	29
1.4.5 Ruolo del sistema endocannabinoide nel comportamento alimentare.....	35
1.4.6 Ruolo del sistema endocannabinoide nella patologia dell'anoressia nervosa	39
1.5 Trattamenti farmacologici nell'AN	41
1.6 L' epigenetica nei disturbi alimentari.....	43
1.6.1 Effetto delle modificazioni epigenetiche a carico del sistema endocannabinoide nell'anoressia nervosa	48
1.7 Gli acidi grassi e il loro ruolo nel comportamento alimentare	49

1.7.1	Gli acidi grassi.....	49
1.7.2	Ruolo degli acidi grassi nell'anoressia nervosa.....	58
1.7.3	Acidi grassi e sistema endocannabinoide: ruolo nella regolazione del comportamento alimentare.....	61
1.8	Modelli animali di anoressia	63
1.9	<i>Obiettivi dello studio</i>	66
2	Capitolo 2. Materiali e Metodi	69
2.1	Animali.....	69
2.2	Apparato.....	69
2.3	Esperimento 1: studi di espressione genica e di regolazione epigenetica	70
2.3.1	Induzione del modello activity-based anorexia	71
2.3.2	Real-time qPCR (RT-qPCR)	71
2.3.3	Analisi della metilazione del DNA.....	72
2.3.4	Immunoblotting.....	73
2.4	Esperimento 2: Livelli DA, DOPAC e HVA e densità dei recettori D2	74
2.4.1	Induzione del modello activity-based anorexia	75
2.4.2	Fase di recovery del modello activity-based anorexia.....	75
2.4.3	Misurazione dei livelli di neurotrasmettitori	75
2.4.4	Studi di binding recettoriale	76
2.5	Esperimento 3: fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia e analisi delle componenti lipidiche plasmatiche negli animali	77
2.5.1	Fase acuta del protocollo activity-based anorexia.....	78
2.5.2	Fase cronica del protocollo activity-based anorexia.....	78

2.5.3	Misurazione degli acidi grassi nel plasma al termine della fase cronica del protocollo activity-based anorexia.....	79
2.6	Analisi statistica	80
3	Capitolo 3. Risultati.....	81
3.1	Esperimento 1: studi di espressione genica e di regolazione epigenica	81
3.1.1	Dati comportamentali induzione del modello activity-based anorexia: fase precoce ...	81
3.1.2	Dati comportamentali induzione del modello activity-based anorexia: fase tardiva.....	82
3.1.3	Analisi genetiche ed epigenetiche delle componenti del sistema endocannabinoide al termine della fase precoce e tardiva del protocollo activity-based anorexia	83
3.2	Esperimento 2: livelli DA, DOPAC e HVA e densità dei recettori D2.....	89
3.2.1	Dati comportamentali: induzione e recovery del protocollo activity-based anorexia ...	89
3.2.2	Livelli cerebrali di DA, DOPAC ed HVA nella PFC, Cpu, nel NAcc e nell'Hyp al termine della fase di induzione e recovery del protocollo activity-based anorexia.....	91
3.2.3	Densità dei recettori D2 nella CPU e nel Nacc al termine della fase di induzione e recovery del protocollo activity-based anorexia.....	94
3.2.4	Esperimento 3: fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia e analisi delle componenti lipidiche plasmatiche negli animali	96
	Fase acuta del protocollo activity-based anorexia.....	96
3.2.5	Fase cronica del protocollo activity-based anorexia.....	99
3.2.6	Peso corporeo nella 1 st c-ABA e 1 st R-cABA e nella 2 nd c-ABA e 2 nd R-cABA.....	99
3.2.7	Consumo di cibo nella 1 st c-ABA e 1 st R-cABA e nella 2 nd c-ABA e 2 nd R-cABA	100
3.2.8	Attività fisica nella 1 st c-ABA e 1 st R-cABA e nella 2 nd c-ABA e 2 nd R-cABA.....	102

3.2.9	Differente rappresentazione di analisi del peso corporeo negli animali ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia	103
3.2.10	Differente rappresentazione di analisi del consumo di cibo negli animali ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia	104
3.2.11	Differente rappresentazione di analisi dell'attività fisica (RWA) negli animali ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia	106
3.2.12	Peso di fegato e VAT al termine della 2 nd cABA e 2 nd R-cABA	107
3.2.13	Livelli plasmatici degli acidi grassi essenziali 18:3 n-3 e 18:2 n-6 al termine della 2 nd cABA e 2 nd R-cABA	108
3.2.14	Livelli plasmatici degli acidi grassi essenziali 20:3 n-9, 20:4 e 20:5 al termine della 2 nd cABA e 2 nd R-cABA	110
4	Capitolo 4. Discussione	112
4.1	Esperimento 1: studi di espressione genica e di regolazione epigenetica	113
4.2	Esperimento 2: livelli DA, DOPAC e HVA e densità dei recettori D2.....	118
4.3	Esperimento 3: fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia e analisi delle componenti lipidiche plasmatiche negli animali	124
5	Bibliografia.....	134
6	Sitografia.....	188

Capitolo 1. Introduzione

1.1 Il comportamento alimentare

L'interazione fra sistema nervoso centrale (SNC) e organi periferici è alla base della regolazione del comportamento alimentare. L'appetito e il peso corporeo sono finemente regolati da svariati circuiti e questi prendono parte alla regolazione sia omeostatica sia edonica che si trova alla base del comportamento alimentare. Infatti, attraverso meccanismi complessi regolano l'apporto e il dispendio di energia da parte dell'organismo.

1.1.1 *La regolazione omeostatica del comportamento alimentare*

Il SNC ha un'azione molto importante nel mantenere bilanciati la richiesta energetica necessaria per sopravvivere e l'energia ottenuta dall'alimentazione. Diverse sono le aree coinvolte in queste azioni, una in particolare è l'ipotalamo (Hyp). L'Hyp è un area cerebrale altamente implicata nella regolazione del metabolismo ed è coinvolta in molti processi come l'assunzione di cibo, la regolazione della temperatura corporea, il comportamento sessuale e riproduttivo, il ritmo circadiano e le risposte emotive (Cornejo *et al.*, 2016). L'Hyp è formato da vari nuclei che integrano segnali nervosi, endocrini e metabolici. Esso comprende il nucleo arcuato (ARC), il nucleo paraventricolare (PVN), il nucleo ventromediale (VMN), il nucleo dorsomediale (DMN) e il nucleo laterale (LH) (Williams *et al.*, 2001). Ogni nucleo ipotalamico è in stretta correlazione con importanti aree cerebrali formando una rete molto complessa di connessioni anatomiche. Questo sistema così interconnesso è alla base della regolazione del comportamento alimentare e del bilancio energetico attraverso i circuiti anoressigenici e oressigenici (Morton *et al.*, 2006). L'Hyp include due importanti centri regolatori dell'alimentazione: il *centro della fame*, composto dal nucleo LH, la cui stimolazione o lesione può causare rispettivamente un aumento o una diminuzione dell'assunzione di cibo e acqua, e il *centro della sazietà* composto dal nucleo VMN e dal PVN, la cui stimolazione o lesione, rispettivamente, porta ad ipofagia e obesità (Hetherington e Ranson, 1942). Il nucleo arcuato (ARC) si trova adiacente al terzo ventricolo e all'eminenza mediana, non è protetto dalla barriera emato-encefalica (BEE) e dal rivestimento ependimale che lo separa dal terzo ventricolo (Brightman e

Broadwell, 1976). Questo favorisce la diffusione degli ormoni che dalla periferia raggiungono l'Hyp attraverso il sistema circolatorio rendendo possibile l'accesso diretto di questo nucleo con il liquor (Roh e Kim, 2016). ARC è considerato il nucleo che prima di tutti riceve e integra i segnali dalla periferia che possono raggiungerlo mediante il sistema circolatorio (Funahashi *et al.*, 2000). E' stato dimostrato che nei topi, una lesione di ARC causa iperfagia e obesità (Olney, 1969). Una volta integrati i segnali che sopraggiungono dalla periferia vengono attivate due differenti popolazioni di neuroni. Un gruppo di neuroni, detti di primo ordine, produce ormoni oressigenici, il neuropeptide Y (NPY) e la proteina agouti-correlata (AgRP), ed una volta che vengono stimolati promuovono l'assunzione di cibo. L'altra popolazione neuronale, detti neuroni di secondo ordine, esprime il peptide anoressigenico proopiomelanocortina (POMC) e il trascritto regolato dalla cocaina e dell'amfetamina (CART). L'azione degli ormoni metabolici quali leptina, insulina e grelina agisce per primo su questi neuroni. La loro stimolazione reprime l'assunzione di cibo, avendo quindi un effetto anoressizzante. Queste popolazioni neuronali sono influenzate dai segnali di fame e sazietà che sopraggiungono dalla periferia e quando un gruppo di neuroni è attivato l'altro viene inibito e viceversa. Per quanto riguarda gli ormoni prodotti in questo nucleo, come detto sopra, troviamo l'NPY, il neuropeptide più abbondante nel cervello (Sajdyk *et al.*, 2004) implicato in moltissime funzioni come appunto l'assunzione di cibo ed il ritmo circadiano, è coinvolto inoltre nella regolazione degli aspetti cognitivi e nel controllo dell'omeostasi energetica (Eaton *et al.*, 2007; Morin, 2013; Zhang e Martin, 2018). Nei ratti, l'infusione diretta di NPY nel terzo ventricolo aumenta il consumo di cibo (Flynn *et al.*, 1999). AgRP è un peptide espresso esclusivamente nel nucleo ARC (Broberger *et al.*, 1998) e se somministrato ICV porta ad un comportamento iperfagico (Kim, 2012). I topi che possiedono la deplezione dei neuroni NPY/AgRP sono caratterizzati da ridotta assunzione di cibo e diminuzione del peso corporeo (Bewick *et al.*, 2005). La melanocortina è un peptide bioattivo che deriva dal suo precursore POMC (Arora e Anubhuti, 2006). Il gene per la POMC è espresso nei mammiferi in diversi organi e tessuti come il lobo intermedio della ghiandola pituitaria dove viene prodotto l' α -MSH, un peptide che attiva i recettori per la melanocortina MC3 e MC4, inibendo l'assunzione di cibo. CART è un neuropeptide presente in diverse aree del cervello umano ed agisce come mediatore anoressigenico ed è coinvolto nei complessi

meccanismi che regolano il comportamento alimentare (Thim *et al.*, 1998). In particolare, la somministrazione ICV di CART diminuisce l'assunzione di cibo nei roditori (Kristensen *et al.*, 1998).

Il nucleo LH dell'Hyp fa parte del centro della fame ed è composto da due differenti tipologie di neuroni, omogeneamente distribuite, che sintetizzano peptidi oressigenici come l'orexina e l'ormone melanotropo (MCH), in grado di stimolare l'appetito e ridurre il metabolismo. MCH ha effetti oressigenici quando infuso ICV nel ventricolo laterale del ratto, mentre la fame porta ad un aumento dell'mRNA di MCH (Qu *et al.*, 1996).

VMN è a tutt'oggi considerato un nucleo che agisce inibendo il nucleo LH e come stazione di rilascio di fibre oressigeniche e anoressigeniche che fanno parte del sistema regolatore dell'Hyp. Il PVN è molto importante nel rilascio di segnali oressigenici, esso rilascia una grande quantità di neuropeptidi. Il più importante è l'ormone di rilascio di corticotropina (CRH) e l'ormone di rilascio della tireotropina (TRH), entrambi con attività anoressizzante.

Fra i neuropeptidi che fanno parte dei segnali della fame troviamo la grelina che viene secreta nell'uomo dalle cellule P/D1 dello stomaco e dalle cellule epsilon del pancreas. Questo peptide è inoltre secreto da altri organi come l'Hyp e nei ratti dal pancreas, inoltre, l'mRNA della grelina è stato trovato in diversi altri organi (Date *et al.*, 2000). Il fattore scatenante il rilascio di grelina è la fame. Le concentrazioni plasmatiche di grelina aumentano durante il digiuno e diminuiscono dopo l'assunzione di cibo. Non è stato ancora ben chiarito quali siano i meccanismi che sottendono il rilascio di grelina. La grelina mediante il nervo vago agisce a livello centrale, maggiormente nell'Hyp, attraverso il circolo sanguigno, per stimolare l'appetito; nel nucleo ARC (Sam *et al.*, 2012) si lega ai propri recettori (GH-R) che si trovano sui neuroni che rilasciano NPY/AgRP (Cowley *et al.*, 2003; Kamegai *et al.*, 2001) e nelle fibre che rilasciano orexina nel nucleo LH (Toshinai *et al.*, 2003). L'attivazione di questi neuroni porta al rilascio di NPY e AgRP che da un lato stimolano PVN coinvolto nelle funzioni metaboliche e dall'altro lato inducono il rilascio di MCH e orexina dal nucleo LH. La grelina inoltre stimola l'assunzione di cibo quando infusa direttamente nel PVN (Shrestha *et al.*, 2004). Il risultato finale è un aumento del consumo di cibo e una diminuzione nel metabolismo.

La leptina e l'insulina invece, fanno parte dei segnali di sazietà. La leptina è una proteina conosciuta per il suo ruolo di soppressore della fame e nella regolazione del dispendio energetico. La leptina è secreta dagli adipociti, ma è stata anche trovata nello stomaco e nella ghiandola pituitaria (Berthoud, 2006; Fox *et al.*, 2006; Rolls, 2011). Il tessuto adiposo rimane comunque la fonte responsabile del 95 % della leptina prodotta (Rolls, 2011). I livelli di leptina circolanti sono correlati in modo proporzionale con l'indice di massa corporea (BMI) e con la quantità di tessuto adiposo. La produzione di leptina è influenzata da diversi fattori regolatori, essendo stimolata dall'insulina e dal glucosio ematico ma inibita dall'attività simpatica, dalle catecolamine lipolitiche e dagli acidi grassi liberi (FFA). Proprio per questo motivo i livelli di leptina sono maggiori nelle donne rispetto agli uomini (Sinha *et al.*, 1996). E' stato dimostrato che i roditori con deficit di leptina (topi *ob/ob*) o del recettore per la leptina (OB-R, topi *db/db* e ratti Zucker *fa/fa*) sono obesi e iperfagici. La mancanza di leptina nell'uomo, situazione molto rara, è associata a severa obesità che può essere migliorata attraverso la somministrazione di leptina (Farooqi *et al.*, 1999). La leptina circolante è trasportata attraverso la BEE ed agisce nel nucleo ARC con effetto anoressizzante, nello specifico agendo sui neuroni NPY/AgRP e POMC/CART che esprimono i recettori per la leptina (OB-R) (Baskin *et al.*, 1999; Faouzi *et al.*, 2007).

L'insulina è prodotta dalle cellule beta delle isole di Langerhans nel pancreas. I recettori per l'insulina sono ampiamente distribuiti nel cervello, ma principalmente nei nuclei ipotalamici coinvolti nella regolazione dell'assunzione di cibo. Quando somministrata ICV direttamente nel nucleo VMN possiede un effetto anoressizzante, e questo effetto viene revertito dagli anticorpi per l'insulina (McGowan *et al.*, 1992). La mancanza di insulina è associata ad un aumento di NPY, mentre la somministrazione inibisce l'espressione ipotalamica di NPY. L'azione centrale dell'insulina promuove la riduzione dell'assunzione di cibo perché diminuisce l'espressione di NPY e stimola quella della POMC (Porte *et al.*; 2005). L'insulina si lega ai suoi recettori altamente espressi nei neuroni POMC/CART e NPY/AgRP. L'insulina e la leptina attivano entrambi i neuroni che esprimono POMC, ma sembrano regolare in modo differente i neuroni AgRP dove la leptina ha un'azione inibitoria mentre l'insulina, al contrario, ha un'effetto stimolatorio (Xu *et al.*, 2005).

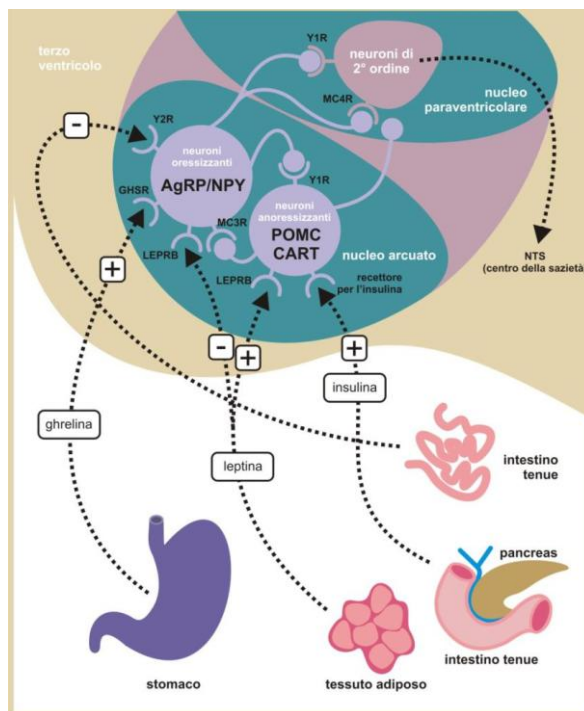


Figura 1. Rappresentazione dei segnali che dalla periferia raggiungono i nuclei ipotalamici e regolano il comportamento alimentare (<http://ghrelinafisio.blogspot.com/2012/07/regulacion-de-su-secrecion.html>).

1.1.2 La regolazione edonica dell'assunzione di cibo

La regolazione omeostatica dell'appetito e dell'assunzione di cibo si basa sul controllo del bilancio energetico e sulla regolazione dell'assunzione di cibo. Ma esiste anche un altro tipo di controllo "edonico" ovvero "non-omeostatico" che porta un individuo a mangiare anche in assenza dello stimolo della fame. Questo aspetto coinvolge molti fattori quali quelli cognitivi, di rinforzo ed emozionali e vari sistemi in particolare quello della gratificazione (Bergstrom e Pinard, 2017). Il sistema della gratificazione o della ricompensa detto anche di *reward* è formato da un insieme di neuroni, cellule nervose ed aree cerebrali che sono coinvolte nei processi nervosi alla base dei comportamenti di gratificazione. La ricompensa è la capacità di un oggetto, una sostanza o un particolare cibo di stimolare un comportamento di avvicinamento e di successiva scelta del consumo della stessa (Berridge, 2012; Berridge e Kringelbach, 2015; Schultz, 2015). L'associazione tra ricompensa e uso di sostanze è ormai noto come è ormai dimostrato che le sostanze d'abuso, come il cibo, siano in grado di aumentare i livelli di dopamina (DA) in determinate aree deputate ai processi di gratificazione e ricompensa (Chiara e Imperato, 1988; Wise, 2009). Il sistema della

gratificazione coinvolge diverse aree e nuclei cerebrali: le regioni corticali, i gangli della base ed il talamo (Yager *et al.*, 2015). I neuroni dopaminergici presenti nella VTA proiettano verso aree cerebrali come il Nucleus Accumbens (NAcc), l'Hyp laterale e la PFC (corteccia prefrontale) (Calabresi *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2015). Lo striato invece, anch'esso importante nei circuiti della gratificazione, integra i segnali provenienti dalle regioni corticali, dai gangli della base, dalla corteccia, i segnali GABAergici provenienti dagli interneuroni striatali, gli stimoli colinergici e quelli dopaminergici provenienti in particolare dalla VTA e dalla SN (Dautan *et al.*, 2014; Swanson, 1982; Yager *et al.*, 2015). Inoltre riceve *input* glutamatergici che provengono dalla PFC, dall'Amy, dall'Hipp e dal talamo (Britt *et al.*, 2012; Swanson, 1982).

Il consumo di cibo provoca effetti sia di rinforzo che di gratificazione e attiva le regioni cerebrali associate ai circuiti di *reward* (Hebebrand *et al.*, 2014). Il sistema della gratificazione associato al consumo di cibo consiste di due componenti, una sensoriale e una post-ingestione (Avena *et al.*, 2008). I segnali gustatori che provengono dai recettori per il gusto raggiungono il talamo terminano nella corteccia orbito frontale e nell'insula anteriore (Kobayakawa *et al.*, 1999; Small, 2006). L'Amy invece è coinvolta in tutte le vie legate all'aspetto gustatorio ed è interconnessa con le diverse aree cerebrali che fanno parte di queste vie (Yang, 2010). I circuiti della gratificazione vengono maggiormente attivati quando avviene il consumo di cibo palatabile che comporta un maggiore rilascio di DA a livello della Shell del NAcc, rispetto a cibi normali (Di Chiara e Bassareo, 2007; Martel e Fantino, 1996). I pazienti affetti dalla malattia di Parkinson (PD) possiedono una degenerazione a livello dei neuroni dopaminergici della SN del mesencefalo che comporta una diminuzione del consumo di cibo rispetto ai soggetti sani (Nirenberg e Waters, 2006). Studi di brain imaging hanno dimostrato una maggiore attivazione della corteccia orbito frontale, dell'insula, dell'Amy e di altre regioni associate alla gratificazione, in risposta alla visualizzazione di immagini raffiguranti cibi palatabili, in soggetti obesi rispetto a soggetti sani (Rothenmund *et al.*, 2007; Stice *et al.*, 2008; Stoeckel *et al.*, 2008).

Le regioni mesolimbiche attivate dal prolungato consumo di sostanze d'abuso presentano modificazioni cellulari e molecolari che possono essere alla base dei comportamenti di dipendenza. Le stesse modifiche sono state ritrovate nella regione limbica di ratti a cui è stato somministrato cibo altamente palatabile. Ad esempio, topi

nutriti con cibo ricco in grassi per 4 settimane mostrano diminuiti livelli del fattore di trascrizione cellulare CREB (cAMP response element-binding protein) nello striato (Lutter e Nestler, 2009; Nestler, 2005). La diminuzione delle concentrazioni di CREB nello striato ventrale è associata con l'aumento di preferenza sia per soluzioni contenenti saccarosio ma anche per la morfina (Barrot *et al.*, 2002).

I neuropeptidi coinvolti nel comportamento alimentare possono modulare in modo diretto l'attività dei neuroni mesolimbici dopaminergici. I neuroni per la DA presenti nella VTA esprimono i recettori per la leptina, per la grelina, insulina, orexina e melanocortina (Dossat *et al.*, 2013, 2011; Hommel *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2010). La grelina, peptide oressigenico, in seguito al consumo di cibo, è in grado di aumentare l'attività dei neuroni dopaminergici nella VTA e aumentare il rilascio di DA nel NAcc aumentando così il consumo di cibo (Jerlhag *et al.*, 2012; Skibicka *et al.*, 2013). Al contrario il peptide anoressigenico leptina inibisce l'attivazione dei neuroni dopaminergici e il rilascio di DA diminuendo l'intake di cibo (Johnson e Kenny, 2010; Rada *et al.*, 2005), mentre la diminuzione di leptina nella VTA è associato ad un aumento della sensibilità verso cibi altamente palatabili (Domingos *et al.*, 2011; Hommel *et al.*, 2006; Ishiwari *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2014). Una deplezione dei recettori per la leptina sui neuroni GABAergici porta ad un aumento marcato del peso corporeo. L'effetto della leptina a livello della VTA potrebbe essere indiretto e mediato dagli interneuroni GABAergici piuttosto che invece da un effetto diretto a livello dei neuroni dopaminergici nella VTA (Vong *et al.*, 2011). Oltre al sistema dopaminergico mesencefalico, anche i neuroni serotoninergici (5-idrossitriptamina, 5-HT) localizzati nel nucleo dorsale del raphe sono interconnessi con neuroni monoaminergici e coinvolti nel consumo di cibo (Muzerelle *et al.*, 2016; Ogawa *et al.*, 2014; Pollak Dorocic *et al.*, 2014). L'aumento farmacologico della serotonina (5HT) si traduce poi in una diminuzione del consumo di cibo al contrario invece la somministrazione di antagonisti fa sì che diminuiscano l'attività dei neuroni 5HT portando ad un aumento dell'assunzione di cibo (Blundell, 1986; Simansky, 1995). Topi che non possiedono i recettori serotoninergici 5-HT_{2C} o 5HT_{1B} risultano essere iperfagici e obesi (Bouwknicht *et al.*, 2001; Tecott *et al.*, 1995) e questi neuroni sono in grado di bloccare l'assunzione di cibo agendo e interagendo nel nucleo ARC dell'Hyp sui neuroni AgRP e POMC aumentando il rilascio di α -MSH ed anche di β -endorfina che va a legarsi ai

recettori per gli opiodi (Heisler *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2013). Anche gli oppioidi sono altamente coinvolti nell'assunzione di cibo grazie anche alla presenza dei loro recettori in molte regioni cerebrali come l'Hyp, e risultano avere un ruolo fondamentale nell'aspetto gratificante dovuto all'assunzione di cibo (Kelley *et al.*, 2002). Il naloxone, antagonista oppioide, è in grado di bloccare l'effetto dell'AgRP nell'aumento del consumo di cibo (Hagan *et al.*, 1998).

1.2 Disturbi del comportamento alimentare

“I disturbi della nutrizione e dell'alimentazione sono caratterizzati da un persistente disturbo dell'alimentazione o di comportamenti collegati con l'alimentazione che determinano un alterato consumo o assorbimento di cibo e che danneggiano significativamente la salute fisica o il funzionamento psicosociale” (APA, 2013). Nella quinta edizione del Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Mustelin *et al.*, 2016) è stata proposta una nuova classificazione dei disturbi dell'alimentazione con l'inclusione di nuove categorie diagnostiche e la modifica di diversi criteri per la diagnosi. Nella sezione dedicata ai “Disturbi della nutrizione e dell'alimentazione” vengono elencate otto categorie diagnostiche principali ed i criteri che devono essere verificati e soddisfatti per una corretta diagnosi.

I disturbi della nutrizione elencati sono pertanto i seguenti:

- pica (pica)
- mericismo (rumination disorder)
- disturbo alimentare evitante/restrittivo (avoidant/restrictive food intake disorder)
- anoressia nervosa (anorexia nervosa)
- bulimia nervosa (bulimia nervosa)
- disturbo di alimentazione incontrollata (binge eating disorder)
- disturbo della nutrizione o dell'alimentazione con specificazione
- disturbo della nutrizione o dell'alimentazione senza specificazione

In questo lavoro di tesi verrà trattata in dettaglio l'anoressia nervosa (AN), un disturbo alimentare caratterizzato prevalentemente da un'eccessiva restrizione alimentare e da altri sintomi che vedremo meglio nel dettaglio.

1.3 Anoressia Nervosa

1.3.1 Definizione e classificazione

L'anoressia nervosa (AN) è considerata un disordine alimentare ed è tra i disturbi psichiatrici, la patologia con il più alto tasso di mortalità (Arcelus *et al.*, 2011; Smink *et al.*, 2012). È una patologia cronica e altamente invalidante, caratterizzata da un'eccessiva restrizione alimentare, spesso associata ad un'intensa attività fisica, e ad un forte controllo del peso corporeo (Smink *et al.*, 2013). L'AN è più comune nelle donne rispetto agli uomini, e tendenzialmente ha esordio nell'età adolescenziale, spesso è accompagnata ad altri disturbi psichiatrici quali depressione, ansia e abuso di sostanze (Kaye *et al.*, 2004; Blinder *et al.*, 2006; Hudson *et al.*, 2007).

Secondo la 5^a edizione del “ Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders “ (DSM-5), i criteri diagnostici includono: *“restrizione dell'assunzione di calorie in relazione alle necessità, che porta a un peso corporeo significativamente basso nel contesto di età, sesso, traiettoria di sviluppo e salute fisica. Il peso corporeo significativamente basso è definito come un peso inferiore al minimo normale oppure, per bambini e adolescenti, meno di quello minimo atteso. Intensa paura di aumentare di peso o di diventare grassi, oppure un comportamento persistente che interferisce con l'aumento di peso, anche se significativamente basso. Alterazione del modo in cui viene vissuto dall'individuo il peso o la forma del proprio corpo, eccessiva influenza del peso o della forma del corpo sui livelli di autostima, oppure persistente mancanza di riconoscimento della gravità dell'attuale condizione di sottopeso.”* (<http://www.dallegrove.it/quinta-edizione-del-diagnostic-and-statistical-manual-of-mental-disorders-dsm-5-quali-sono-le-novita-riguardanti-i-disturbi-della-nutrizione-e-dell'alimentazione/>).

Il DSM-5 ha abolito un criterio diagnostico presente nel DSM IV riguardante l'amenorrea in quanto non può essere applicato nei maschi, alle donne in menopausa o che assumono farmaci estroprogestinici e soprattutto perché spesso le pazienti anoressiche mostrano tutti i sintomi ma presentano il ciclo mestruale.

I criteri diagnostici riguardanti l'AN presenti nel DSM-5 sono i seguenti:

1. *Restrizione dell'assunzione di calorie in relazione alle necessità, che porta a un peso corporeo significativamente basso nel contesto di età, sesso, traiettoria di*

sviluppo e salute fisica. Il peso corporeo significativamente basso è definito come un peso inferiore al minimo normale oppure, per bambini e adolescenti, meno di quello minimo atteso.

- 2. Intensa paura di aumentare di peso o di diventare grassi, oppure un comportamento persistente che interferisce con l'aumento di peso, anche se significativamente basso.*
- 3. Alterazione del modo in cui viene vissuto dall'individuo il peso o la forma del proprio corpo, eccessiva influenza del peso o della forma del corpo sui livelli di autostima, oppure persistente mancanza di riconoscimento della gravità dell'attuale condizione di sottopeso.*

Il DSM-5 identifica due sottotipi di AN che differiscono per il tipo di meccanismo con il quale viene perso peso corporeo. Il sottotipo detto *con crisi bulimiche e/o condotte di eliminazione*: il paziente affetto da questa tipologia di AN presenta episodi ricorrenti di abbuffata seguiti da episodi di vomito autoindotto, un uso eccessivo di lassativi, diuretici o eteroclistmi. L'altra tipologia è detta *restrittiva*: la perdita di peso avviene mediante una dieta ipocalorica, attraverso il digiuno e grazie ad un'intensa attività fisica. Tuttavia questi due sottotipi possono presentarsi entrambi nel paziente o trovarsi in una fase di transizione da un sottotipo all'altro.

I fattori che contribuiscono all'insorgere di questa patologia sono di tipo sociale, psicologico ma anche biologico. Infatti recenti studi hanno dimostrato come il fattore genetico sia alla base di questa patologia, contribuendo, come fattore di rischio, per circa il 50-80% (Thornton *et al.*, 2011). Questo dimostra che alla base dell'AN ci siano molteplici fattori di rischio che possono essere biologici, biochimici e ambientali (Shih *et al.*, 2016).

1.3.2 *Epidemiologia*

L'AN è il disordine alimentare tra le patologie psichiatriche ad avere, nelle donne, una percentuale di insorgenza di 1.2-2.2 % e di 0.2-0.9 % (Smink *et al.*, 2012; Bulik *et al.*, 2006). I recenti cambiamenti riguardanti i criteri diagnostici, come l'eliminazione dell'amenorrea, ha portato ad un aumento dei casi riportati (Mustelin *et al.*, 2016). Le

donne sono maggiormente affette da AN dieci volte di più rispetto agli uomini, anche se questo disturbo è sotto diagnosticato e poco riconosciuto nell'uomo (Hoek, 2006). Il 40% dei pazienti affetti da AN hanno tra i 15 e i 19 anni, fascia di età in cui l'insorgenza della malattia è più comune. Circa 4-8 persone su 100'000 all'anno vengono colpite da questa patologia e in particolare circa 110 su 10'000 donne hanno tra i 15 ed i 19 anni (Lucas *et al.*, 1999). Il picco di incidenza è stato attestato fra i 14 ed i 18 anni, l'85% dei casi si manifesta prima dei 20 anni di età e quasi tutti i casi si manifestano prima dei 25 anni (Herpertz-Dahlmann, 2015.). Sono rari i casi di anoressia prima dei 13 anni di età (Smink *et al.*, 2012).

Uno studio effettuato su pazienti anoressici riporta che il $46.9 \pm 19.7\%$ guarisce dalla patologia, il $33.5 \pm 17.8\%$ migliora e il $20.8 \pm 12.8\%$ soffre di anoressia cronica (Steinhausen 2002). La variabilità relativa al tipo di decorso della malattia dipende da diversi fattori che comprendono i trattamenti effettuati durante il periodo di ricovero, la durata dei follow-up, la durata della remissione dei sintomi. Il tasso di mortalità dipende da diversi fattori come l'ospedalizzazione, la gravità del disturbo e la terapia intrapresa dai pazienti. Il tasso di mortalità varia in un range che va dallo 0 al 22.5 %. Pazienti che ricevono un trattamento farmacologico e supporto nutrizionale in età adolescenziale hanno un rischio minore di morte (Strober *et al.*, 1997). Diversi studi dimostrano che il rischio di morte nei pazienti, con insorgenza della malattia in adolescenza, dopo di 10-15 anni di follow up è praticamente nullo (Halvorsen *et al.*, 2004; Herpertz-Dahlmann *et al.*, 2015). Questi dati sono molto importanti perché dimostrano che un'accurata diagnosi con un successivo supporto terapeutico riducono i rischi di mortalità, il 20% delle pazienti non riceve cure specialistiche e questo contribuisce all'aumento della mortalità dovuto alla patologia (Wents *et al.*, 2001; Steinhansen 2002). Le cause che portano alla morte sono varie, prima fra tutte l'alto tasso di depressione, ma anche i disordini affettivi, problemi di inserimento nella società, senso di inadeguatezza (Bulik *et al.*, 2006; Fichter *et al.*, 2006). Altre cause, non legate al suicidio, sono associate all'età, all'eccessiva perdita di peso, all'abuso di alcohol e all'uso smodato di lassativi. In giovanissima età i casi di morte sono inferiori rispetto a quelli che vengono riportati in pazienti a 20 anni di età.

1.3.3 *Caratteristiche e complicanze mediche legate all'AN*

Lo stato acuto di malnutrizione e i comportamenti messi in atto dalle pazienti per perdere peso portano, inevitabilmente, ad un aumento del rischio di contrarre complicazioni mediche e metaboliche gravi. Le pazienti affette da AN sviluppano una lunga serie di problematiche relative alla salute che affliggono vari organi e sistemi e contribuiscono all'alterata condizione medica che porta poi a drammatiche conseguenze (Sullivan, 1995). Non solo, alla patologia sono inoltre legate delle caratteristiche comportamentali peculiari che rendono difficili i trattamenti e l'ospedalizzazione dei pazienti. Vedremo di seguito quali sono.

Complicanze legate all'AN		
<i>Gastrointestinali</i>	disturbi della motilità gastrointestinale, lacerazione della mucosa esofagea, squilibrio idroelettrolitico, dolore e gonfiore, steatosi epatica	Mitchell <i>et al.</i> , 2006 Chial <i>et al.</i> , 2002
<i>Renali</i>	riduzione della capacità del rene di concentrare le urine, aumento dell'urea plasmatica, alterazione elettrolitica, ipofosfatemia, ipokalemia e ipomagnesemia, l'intossicazione da acqua	Winston, 2012
<i>Ematologiche</i>	alterazioni dei globuli bianchi, rossi e delle piastrine, anemia, disidratazione, neutropenia, trombocitopenia	Caregaro <i>et al.</i> , 2005 Kennedy <i>et al.</i> , 2004 Hütter <i>et al.</i> , 2009
<i>Dermatologiche</i>	cute secca e disidratata (xerosis), acne, dermatiti, alopecia, aumento della peluria sul corpo (lanugo), colorito giallastro alle estremità (ipercarotemia), eruzioni cutanee	Gravina <i>et al.</i> , 2018
<i>Scheletriche e Muscolari</i>	osteopenia, atrofia dell'apparato muscolare, ritardo nell'accrescimento o addirittura un arresto della crescita ossea (in caso di insorgenza dell'AN prima del menarca)	Grinspoon <i>et al.</i> , 2000 Bachrach <i>et al.</i> , 1991; Herzog <i>et al.</i> , 1993
<i>Cardiologiche</i>	bradicardia, ipotensione arteriosa, tachicardia, forti aritmie, atrofia della muscolatura, ridotta funzionalità cardiaca	Galetta <i>et al.</i> , 2003 Katzman, 2005 Casiero <i>et al.</i> , 2006
<i>Endocrinologiche</i>	ipoglicemia, disfunzioni a livello della tiroide, ipotermia, ipotiroidismo, amenorrea primaria e secondaria, atrofia di utero ed ovaie, infertilità	Mattingly e Bhanji, 1995 Roche <i>et al.</i> , 2005 Usdan <i>et al.</i> , 2008

Tabella 1. Descrizione delle complicanze mediche a carico dei diversi distretti dovute all'AN presenti nei pazienti affetti dalla patologia.

Comorbidità psichiatriche

L'AN è associata ad un alto tasso di comorbidità psichiatriche, che si manifestano soprattutto durante le fasi acute della patologia (Micaeli *et al.*, 2015). Comorbidità psichiatriche, l'alto rischio di suicidio o di autolesionismo aumentano il rischio di andare incontro a morte nei pazienti affetti da AN (Westmoreland *et al.*, 2016). Studi longitudinali in pazienti anoressici di età compresa fra i 14 ed i 16 anni, hanno mostrato un aumento del rischio di sviluppare disordini depressivi e ansia.

Due terzi dei pazienti con un disturbo alimentare persistente e un terzo che invece non soddisfaceva più i criteri diagnostici, presentava almeno un disturbo psichiatrico (Halvorsen *et al.*, 2004). Uno studio di follow-up di 12 anni su pazienti anoressici ha mostrato un alto tasso di incidenza di disordini psichiatrici nel corso della vita rispetto ai soggetti sani. Rispettivamente, il 51.4% e il 35.7% presentava disturbi depressivi, il 21% ed il 10.2% abuso di alcohol, nel 30% dei pazienti e nel 12.2% abuso di altre sostanze e nel 60% contro il 32.7% ansia (Sullivan *et al.*, 1995).

Spesso i disordini psichiatrici rappresentano un fattore importante che influenza negativamente l'efficacia della terapia e non solo, risulta preponderante affinché avvenga una completa ripresa dalla patologia e nel rischio di ricadute che sono frequenti. (Carter *et al.*, 2004; Bergh *et al.*, 1996). Uno studio ha riportato che il 24% di pazienti presentano disordini affettivi, il 12% disordini ossessivo compulsivi e ancora 14.56% abuso di sostanze e 4.6% episodi di schizofrenia (Bergh *et al.*, 1996). Spesso è difficile stabilire se i sintomi psicologici siano la causa o la conseguenza della malattia, ma è stato dimostrato come in pazienti AN, dopo un periodo di *recovery* e quindi di ri-alimentazione, questi sintomi siano migliorati (Meehan *et al.*, 2006).

L'ansia è spesso associata con comportamenti alimentari alterati quali il vomito (Carter & Duncan, 1984), abuso di lassativi (Weltzin *et al.*, 1995) ed eccessiva restrizione alimentare (Chesler, 1995), che portano ad un insuccesso terapeutico o ad un interruzione prematura della terapia.

Per quanto riguarda la depressione, ci sono molte evidenze che mettono in relazione l'elevato rischio di sviluppare disordini alimentari per coloro che soffrono di questo disturbo (Sihvola *et al.*, 2009) sia le alte probabilità di svilupparla in seguito all'insorgere di patologie legate al cibo (Ivarsson *et al.*, 2000; Zaidler *et al.*, 2002). Studi

di follow-up dimostrano che la depressione può sia precedere che seguire l'insorgenza dell'AN (Godart *et al.*, 2005). Un altro aspetto legato ai disordini alimentari, nello specifico, all'AN è la fobia sociale (SP) che rende difficile il trattamento della patologia soprattutto se associato a disordini depressivi (Ranta *et al.*, 2017). Inoltre, anche in questo caso, l'ansia sociale può predisporre a sviluppare disordini alimentari, soprattutto negli adolescenti. La paura del giudizio altrui, la grande sfiducia in se stessi per paura delle opinioni negative da parte degli altri rendono la SP longitudinalmente collegata alla depressione e ai disturbi alimentari (Crozier e Alden, 2005; Kaye *et al.*, 2004; Pallister e Waller, 2008). Un altro aspetto molto importante è l'associazione tra lo sviluppo di disturbi alimentari e l'uso di sostanze come marijuana, steroidi ed inalanti, ma anche nicotina, alcol e caffeina (Burgalassi *et al.*, 2009; Field *et al.*, 2012; Fouladi *et al.*, 2015; Pisetsky *et al.*, 2008).

Aspetti comportamentali legati all'anoressia nervosa: l'iperattività

L'iperattività è uno dei sintomi chiave della patologia e causa varie complicazioni mediche, ed affligge circa il 30-80% dei pazienti (Hebebrand *et al.*, 2003). A tutt'oggi non esistono particolari trattamenti o linee guida standardizzate per il trattamento dell'eccessiva attività fisica (Zunker *et al.*, 2011). L'aumento dell'attività fisica in pazienti anoressici è già stato ampiamente descritto ma non esiste una comune definizione per l'iperattività nell'AN. Le ipotesi alla base di questo fenomeno sono varie e così anche le sue descrizioni. L'attività fisica legata alla patologia si presenta in vari modi e così viene identificata spesso come iperattività, irrequietezza motoria, irrequietezza diffusa, esercizio compulsivo o esercizio eccessivo (Hebebrand *et al.*, 2003). Si manifesta anche in diverse forme non solo con un'eccessiva pratica sportiva ma anche con una costante irrequietezza, la decisione di stare in piedi piuttosto che seduti per svolgere attività quali mangiare o studiare, utilizzare le scale anziché l'ascensore e camminare per lunghe distanze invece di ricorrere ad un mezzo di trasporto (Gümmer *et al.*, 2015).

L'origine dell'iperattività che si riscontra nei pazienti è ancora in fase di studio. Sono state riscontrate alterazioni della tiroide e del sistema catecolaminergico e serotoninergico (Hebebrand *et al.*, 2003), alterazioni nei livelli di leptina, ormone fortemente implicato in questo aspetto. La somministrazione di leptina nei ratti riduce

l'iperattività indotta dalla fame (Exner *et al.*, 2000). L'eccessivo esercizio fisico si suppone venga messo in atto dai pazienti al fine di ridurre il fenomeno della ruminazione, tipico della patologia, e di contrastare il senso di fame e il pensiero del cibo (Scheurink *et al.*, 2010), l'eccessiva attività fisica riduce infatti l'appetito. Non sono da trascurare gli aspetti cognitivi legati a questa caratteristica, come le complicanze psichiatriche quali i disturbi ossessivo compulsivi, il disturbo d'ansia e depressivo e tutti insieme svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo dell'iperattività. L'esercizio fisico sembra avere un ruolo benefico per affrontare i sintomi depressivi (Bratland-Sanda *et al.*, 2010.; Treasure *et al.*, 2010). L'attività fisica ha molti aspetti in comune con i comportamenti di dipendenza dal momento in cui il rinforzo positivo dato dall'esercizio si riflette su uno stato di piacevolezza durante l'attività fisica attivando i circuiti di ricompensa (Giel *et al.*, 2013). Le conseguenze di un'eccessiva attività fisica negli anoressici non si riflettono solo in un incremento della perdita di peso ma ha anche conseguenze cardiovascolari ed endocrinologiche e infine, ma non meno importante, causa seri problemi al sistema muscolare ed osseo (Bratland-Sanda *et al.* 2010; Haddad *et al.*, 1997). Un ulteriore aspetto da considerare è che l'intensa attività fisica va a sfavore dei trattamenti atti a migliorare la condizione anoressica dei pazienti, incidendo fortemente nel rischio di recidive (Kostrzewa *et al.*, 2013; Solenberger, 2001).

1.3.3.1 *Cronicità e recidività*

L'AN è, fra le patologie psichiatriche, ad avere un alto tasso di recidiva che va dal 30% al 50% con un maggiore rischio di ricaduta nel primo anno successivo al ricovero ospedaliero (Eckert *et al.*, 1995; Pike, 1998). Identificare i fattori associati con le ricadute può essere un buon punto di partenza per poter formulare strategie atte a prevenire queste ricadute. Diversi studi mettono in correlazione la durata della malattia, l'età di insorgenza: più è avanzata più elevato sarà il rischio di ricaduta (Fichter *et al.*, 2006; Pike, 1998). Altri studi si incentrano invece sulla gravità della perdita di peso e sull'eccessivo esercizio fisico, maggiore è la gravità di questi aspetti maggiore il rischio di ricadute (Carter *et al.*, 2004; Keel *et al.*, 2005). Anche il tipo di dieta assunta dai pazienti può influire sulle ricadute. I pazienti che dopo l'ospedalizzazione consumano una dieta a basso contenuto energetico sono maggiormente esposti al rischio di ricadute,

se paragonati a pazienti che assumono una dieta ad alto contenuto energetico e con una varietà maggiore di cibi (Schebendach *et al.*, 2011).

Anche l'indice di massa corporea (BMI) può essere un fattore predittivo per le ricadute, un alto BMI è associato ad una migliore riuscita terapeutica (Clausen, 2008; Löwe *et al.*, 2001; Pike, 1998). È stato visto che anche i livelli di leptina sono generalmente correlati positivamente con il BMI e con la composizione corporea in termini di tessuto adiposo: alti livelli di leptina sono associati con un miglioramento dell'efficacia della terapia. La percentuale di grasso corporeo sembra essere significativamente associata con il risultato terapeutico. Donne AN con basse percentuali di grasso corporeo hanno una percentuale di recupero massimo del 90% del loro peso corporeo, e risulta essere un fattore predittivo dell'esito clinico delle terapie nell'anno successivo all'ospedalizzazione (Mayer *et al.*, 2007). Esistono delle linee guida nel campo dei disturbi alimentari (Association, 2006; Hutschemaekers, 2003) che sono in accordo nell'affermare che la prevenzione delle ricadute nei pazienti AN sia cruciale e che ad oggi ci sia una mancanza di metodologie e di strategie di supporto che implementino la prevenzione delle recidive.

1.4 Neurobiologia dell'anoressia nervosa

Negli animali il comportamento alimentare è basato su molteplici meccanismi implicati nella regolazione del dispendio energetico e il consumo di cibo che servono a far alle necessità energetiche e alla disponibilità di cibo (Morton *et al.*, 2006). Il SN integra i segnali fisiologici provenienti dalla periferia per tradurli e innescare una risposta fisica. Per questo i neuropeptidi hanno un ruolo fondamentale all'interno del SNC così come gli ormoni periferici che circolano nel sangue. Nei disturbi alimentari è stato ampiamente dimostrato come ci siano delle alterazioni sia nei livelli che nella funzionalità di molti neuropeptidi.

NPY

Come ampiamente descritto l'NPY e l'AgRP sono ormoni prodotti sia nel nucleo VM dell'Hyp che nell'ARC (Broberger *et al.*, 1998). Entrambi esercitano un ruolo orexigenico, aumentano l'ACTH, il cortisolo e il rilascio di prolattina e sono coinvolti nella regolazione dell'appetito.

Uno studio ha dimostrato che i pazienti AN sono incapaci di aumentare l'attività del sistema NPY di fronte alla carenza energetica dovuta ad una malnutrizione cronica dimostrando la loro incapacità di adattare il consumo di cibo alla richiesta energetica. Inoltre, suggeriscono che l' α -MSH sia implicato nel piacere dovuto all'assunzione di cibo durante i pasti (Galusca *et al.*, 2015).

Anormali livelli di NPY sono stati riscontrati in pazienti AN e BN dopo l'assunzione di una colazione ad alto contenuto di carboidrati e proteine, suggerendo un'alterazione nella regolazione dell'asse intestino-cervello e indicano come i livelli di NPY plasmatici siano dei validi markers per i disordini alimentari (Sedlackova *et al.*, 2012). L'NPY, indirettamente, ha anche un importante ruolo anti-stress che può essere molto efficace nei pazienti affetti sia da AN che da BN.

Orexina

L'orexina è un neurormone che viene secreto nell'LH ma è anche espresso nei tessuti periferici come i reni, surreni, pancreas, stomaco, ileo, colon e cellule epiteliali (Nakabayashi *et al.*, 2003). L'orexina interagisce con la leptina ed insieme regolano direttamente le vie orexigeniche o indirettamente modulano l'attività dei neuroni orexigenici nel nucleo LH (Louis *et al.*, 2010; Muroya *et al.*, 2004). Neuropeptidi come l'orexina e MCH sono sovra-regolati nei pazienti AN e alla base di questo sono state ipotizzate due differenti cause. Un' *up-regulation* potrebbe essere il risultato di un meccanismo adattativo messo in atto per aumentare l'assunzione di cibo da parte dei neuroni orexinici, oppure una maggiore secrezione di orexina può causare un'avversione al cibo da parte dei pazienti AN dovuto all'aumento dell'ansia causato proprio dall'effetto dell'orexina sul sistema dopaminergico (Gorwood *et al.*, 2016). L'orexina è inoltre coinvolta nella regolazione del sistema endocrino svolgendo un ruolo importante nella secrezione di insulina, glucagone e leptina in risposta al glucosio (Park *et al.*, 2015). Un'alterazione nel segnale orexinico può essere correlata ai disordini alimentari non solo perché regola direttamente l'appetito ma anche il sistema di *reward* ed è implicato nell'ansia.

POMC e CART

POMC è un precursore polipeptidico sintetizzato nella ghiandola pituitaria anteriore che, mediante clivaggio, genera l' α -MSH, l'ACTH, la β -endorfina e la Met-enkefalina. POMC è un peptide anoressigenico e lo troviamo soprattutto nel nucleo ARC dell'Hyp. Infatti, il consumo di cibo dopo il digiuno induce l'attivazione dei neuroni POMC nell'ARC e promuove il senso di sazietà (Fekete *et al.*, 2012). La leptina è un regolatore chiave per l'attivazione del sistema POMC a livello nel SNC, che è coinvolto nell'appetito ma anche nel comportamento alimentare, ciclo riproduttivo, produzione di melanina, tossicomania e nello stress (Millington, 2007; Zhou e Kreek, 2015). Lo stress è correlato ad un aumento dell'mRNA di POMC e ad un aumento dell'attività dei neuroni POMC che vengono rapidamente attivati sotto stimoli stressori (Liu *et al.*, 2007). L'iniezione nel ventricolo cerebrale di agonisti per MC4R attiva l'asse HPA aumentando lo stato ansioso e riducendo l'assunzione di cibo (Klenerova *et al.*, 2008). CART è un peptide anoressizzante espresso sia a livello del SNC che periferico, ed è molto importante per il suo ruolo a livello ipotalamico (Keller *et al.*, 2006). Anche il rilascio di CART a livello ipotalamico è strettamente legato alla leptina ed è stato correlato anch'esso con le dipendenze e la risposta allo stress (Bakhtazad *et al.*, 2016; Elias *et al.*, 1998). La sua somministrazione a livello del ventricolo cerebrale aumenta il dispendio energetico e riduce l'appetito, ma sotto alcuni aspetti a livello ipotalamico, CART può anche svolgere funzioni oressizzanti (Murphy e Bloom, 2005). Un aumento dell'espressione di CART a livello del NAcc nell'AN, mediante l'attivazione dei recettori per la serotonina 5-HT₄, svolge un ruolo importante nell'iperattività (Jean *et al.*, 2007).

Ossitocina

L'ossitocina è un ormone peptidico coinvolto in molti aspetti, come il comportamento sociale e quello sessuale ma svolge anche un ruolo importante nel comportamento parentale (Ross e Young, 2009). Molti studi hanno correlato l'ossitocina con i disturbi alimentari, infatti di recente è stata proposta come alternativa nel trattamento dell'obesità (Altirriba *et al.*, 2015). Gli antagonisti dell'ossitocina aumentano il peso corporeo ed il suo rilascio nel sistema circolatorio è associato con l'inibizione dell'appetito e del segnale CCK (Herisson *et al.*, 2014; Yamashita *et al.*,

2013; Zhang e Cai, 2011). Nelle scimmie, un trattamento cronico di 4 settimane riduce il peso corporeo diminuendo l'assunzione di cibo e incrementando la lipolisi ed il dispendio energetico (Blevins e Baskin, 2015). Questo effetto anoressizzante coinvolge in parte i circuiti della gratificazione ed è in parte causato da una riduzione dello svuotamento gastrico causato dagli antagonisti per il recettore ossitocinico nei ratti (Wu *et al.*, 2008). I livelli circolanti di ossitocina sono modificati nei pazienti AN ma non ci sono invece alterazioni in quelli affetti da bulimia nervosa (BN) (Monteleone *et al.*, 2016). Al contrario, la somministrazione di ossitocina diminuisce l'assunzione di cibo in pazienti affetti da BN ma non in quelli AN (Kim *et al.*, 2015). Altri ormoni, come la leptina, è stato visto essere coinvolti nella regolazione del sistema ossitocinico diminuendo la sua attività (Kutlu *et al.*, 2010).

Grelina

La grelina, detto anche ormone della fame, è espresso nell'uomo dalle cellule P/D 1 dello stomaco (Rindi *et al.*, 2002), si trovano anche in misura minore nel pancreas, cistifellea, fegato, colon e polmoni (Kojima *et al.*, 2001). La grelina è espressa anche nel cervello (Cowley *et al.*, 2003), dove media un effetto paracrino mediante l'attivazione dei neuroni NPY/AgRP e inibendo i neuroni orexigenici POMC, aumentando l'appetito (Kageyama *et al.*, 2010). Non è stata dimostrata una sintesi di grelina a livello del SNC (Cabral *et al.*, 2017), e la maggiore quantità di grelina secreta proviene dallo stomaco quando è privo di cibo (Williams *et al.*, 2003). La grelina aumenta la secrezione e la motilità gastrica il tutto finalizzato alla preparazione del corpo a ricevere cibo (Kirsz e Zieba, 2011). Il recettore per la grelina GHSR (ghreline/growth hormone secretagogue) è l'unico conosciuto fino ad oggi ed è localizzato nelle stesse aree cerebrali di quelli per la leptina (Perello e Dickson, 2015). L'attivazione di questi recettori porta alla sintesi di NPY, aumentando l'appetito, ma il trattamento in pazienti anoressici con la grelina è risultato essere inefficace per stimolare l'appetito (Miljic *et al.*, 2006). L'effetto della grelina si può vedere anche a livello ippocampale, dove media un'azione neurogenica, facilitando la memoria e l'apprendimento agendo anche sull'Amy, in particolare modulando l'arousal e agendo sul comportamento alimentare (Alvarez-Crespo *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017). È ormai

noto che i livelli di grelina nei pazienti AN sono elevati (Blauwhoff-Buskermolen *et al.*, 2017).

Leptina

La leptina, detta anche ormone della sazietà, è un ormone derivante dagli adipociti coinvolto nella regolazione del bilancio energetico a breve e a lungo termine (Blundell *et al.*, 2001). L'attività della leptina è maggiore nel nucleo ARC dell'Hyp dove stimola i neuroni anoressigenici POMC e CRF, inibendo invece i neuroni oreoressigenici NPY/AgRP (Baver *et al.*, 2014; Flak e Myers, 2016).

L'ipoleptinemia è tipica degli anoressici sia a livello plasmatico che nel fluido cerebrospinale (Föcker *et al.*, 2011; Hebebrand *et al.*, 1997). Infatti, bassi livelli circolanti di leptina sono stati trovati sia in pazienti anoressici che bulimici, ma non quelli in sovrappeso come i pazienti affetti da binge eating disorder (BED). Non solo, è stata trovata una correlazione inversa con i livelli plasmatici di leptina e la densità dei recettori per questo ormone nei due gruppi. Un altro ormone molto importante nei disturbi alimentari è la CCK, un ormone gastrointestinale che promuove sazietà, ma è anche correlato con l'ansia, allucinazioni e panico (Lenka *et al.*, 2016; Zwanzger *et al.*, 2012). È stato visto che questo ormone subisce importanti variazioni plasmatiche nei pazienti affetti da AN prima e dopo un pasto (Cuntz *et al.*, 2013). Il glucagone-like peptide 1 (GLP-1) è un ormone che ha anche funzione di neurotrasmettitore nell'inibire l'assunzione di cibo, il dispendio energetico e i livelli di insulina (Richard e Baraboi, 2004; Shah e Vella, 2014). GLP-1 interagendo con leptina e grelina induce un segnale di sazietà diminuendo lo svuotamento gastrico e agendo sul cervello producendo avversione contro il cibo (Monteleone *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2002). Nei pazienti anoressici è fortemente diminuito se comparato con gli individui sani e questo suggerisce un'alterazione nell'omeostasi del glucosio (Tomasik *et al.*, 2004). Il peptide YY (PYY) fa parte della famiglia NPY ed è secreto nell'ileo e nel colon e riveste un ruolo anoressigenico (Karra *et al.*, 2009). Le concentrazioni di PYY aumentano 15 minuti dopo il pasto fino ad un massimo di 90 minuti (Batterham e Bloom, 2003). Nelle persone affette da BN/BED ed AN le concentrazioni plasmatiche sono diminuite (Eddy *et al.*, 2015).

Serotonina

La serotonina è un neurotrasmettitore che viene rilasciato a livello centrale dai neuroni posti nei nuclei del raphe medio e dorsale e che proiettano alle regioni limbiche striatali e corticali. Le proiezioni di questi neuroni all'Hyp sono responsabili del segnale di sazietà (Haleem, 2012). Le proiezioni invece all'Hipp, allo striato, all'Amy e alla corteccia frontale sono importanti nella regolazione dell'umore (Lambe *et al.*, 2011; Mineur *et al.*, 2015; Sumiyoshi *et al.*, 2007). La serotonina modula la fame, il sonno, i comportamenti sessuali, le emozioni e molti processi endocrini (Haleem, 2012). I comportamenti correlati ai disturbi alimentari come l'ansia, la depressione, la compulsività sono spesso legati a delle disfunzioni del sistema serotoninergico (Brewerton, 1992; Kaye, 1997). L'AN e la BN portano allo sviluppo di una personalità egosintonica, ovvero le persone non percepiscono nulla di sbagliato nel loro comportamento e nelle loro azioni, considerandole appropriate e giustificate (Aardema e O'Connor, 2007). Il sistema serotoninergico svolge un ruolo importante quindi nei disordini alimentari ed è coinvolto nelle complicanze psichiatriche dovute alla patologia ed è il sistema bersaglio dei trattamenti farmacologici che risultano ad oggi i più efficaci per AN e BN (Kaye *et al.*, 2005). Molti studiosi indicano nel sistema serotoninergico la principale causa dei sintomi psichiatrici tipici delle patologie alimentari con forte malnutrizione, dovute ad una mancanza di triptofano precursore della serotonina, a causa della dieta fortemente restrittiva (Haider e Haleem, 2000). Il fatto che, il recupero dei livelli di triptofano dopo una dieta bilanciata, porta ad una remissione dei sintomi depressivi nei pazienti anoressici, rafforza ancora di più l'importanza del sistema serotoninergico in queste patologie alimentari (Gauthier *et al.*, 2014).

Sistema opioide

I peptidi opiodi come anche altri neuropeptidi sono coinvolti nel controllo del comportamento alimentare ed è stato visto che la somministrazione ICV nel VMN dell'Hyp di β -endorfine stimola l'appetito in ratti sazi (Grandison e Guidotti, 1977). In generale i ligandi opiodi stimolano l'alimentazione come la loro somministrazione. Contrariamente a queste osservazioni, l'uso cronico di oppiacei nell'uomo come nel

ratto, porta ad una perdita di peso (Aravich *et al.*, 1993). Gli antagonisti oppioidi invece diminuiscono l'assunzione di cibo in diverse specie (Levine *et al.*, 1985). In generale, quando avviene un aumento del consumo di cibo si instaura un aumento dei livelli di oppioidi sia a livello centrale che periferico (Levine *et al.*, 1985). Al contrario, in caso di una diminuzione dell'assunzione calorica non accade il contrario, ovvero una diminuzione dei livelli di oppioidi endogeni. Nei pazienti anoressici si assiste però ad una diminuzione nel CSF di β -endorfine soprattutto in casi in cui il BMI risulta drammaticamente diminuito (Gerner e Sharp, 1982), ma ci sono casi in cui i livelli risultano anche aumentati (Aravich *et al.*, 1993).

Un altro sistema neurotrasmettitoriale ampiamente coinvolto nell'AN è il sistema endocannabinoide che verrà approfondito maggiormente in quanto oggetto di studio nel progetto di tesi.

In questo lavoro di tesi verranno affrontati nel dettaglio due importanti sistemi neurobiologici coinvolti nella fisiopatologia dell'AN, il sistema dopaminergico e il sistema endocannabinoide.

1.4.1 *Il Sistema dopaminergico*

La DA, tra i vari neurotrasmettitori è quello ad avere molteplici ruoli alla base del comportamento alimentare e nell'AN. La DA è un neurotrasmettitore facente parte della famiglia delle catecolamine ed è precursore di noradrenalina e adrenalina, altre due componenti della famiglia delle catecolamine. Una volta sintetizzata la DA viene conservata all'interno di vescicole che vengono immagazzinate nei terminali sinaptici. Nella figura 3 è rappresentata la sintesi della DA a partire dall'amminoacido L-tirosina. Nella figura 4 invece è rappresentato il suo metabolismo con la produzione di DOPAC (acido 3,4-Dihydroxyphenylacetico) ed HVA(acido omovanillico).

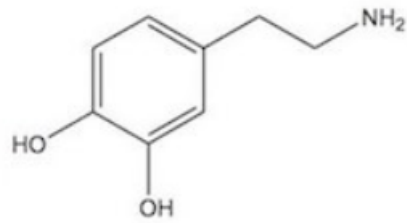


Figura 2. Struttura chimica della DA (internet).

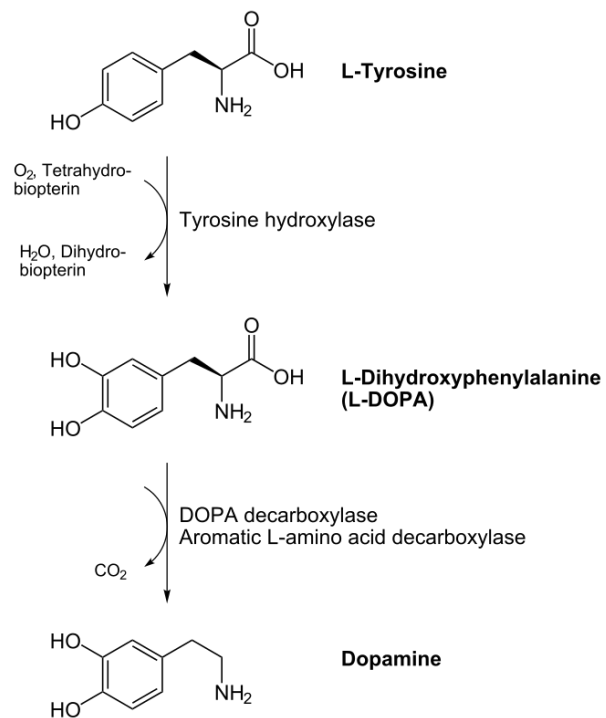


Figura 3. Biosintesi della DA a partire dall'amminoacido tirosina (internet).

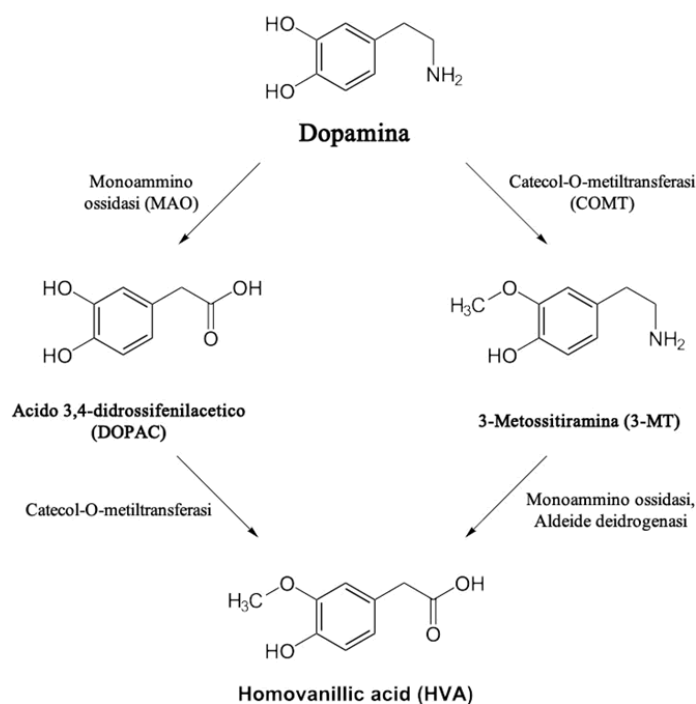


Figura 4. Metabolismo della DA (internet).

I recettori dopaminergici sono classificati, in base all'omologia di sequenza al profilo funzionale e farmacologico in due classi principali: D1 e D2 (Spano *et al.*, 1978). Alla famiglia dei recettori D1-like appartengono i recettori D1 e D5 e alla famiglia D2-like i recettori D2, D3 e D4.

Il recettore D1 è il sottotipo recettoriale maggiormente espresso tra i diversi recettori dopaminergici a livello del SNC nel ratto e nell'uomo (Missale *et al.*, 1998). Questo recettore è espresso sia nella CPU, nel NAcc ma anche nel tubercolo olfattorio, nella corteccia, nel talamo e nell'Hyp. Il recettore dopaminergico D2 è localizzato maggiormente in neuroni non dopaminergici e media funzioni cerebrali, motorie, cognitive e motivazionali (Beaulieu e Gainetdinov, 2011). I recettori D2 costituiscono un importante target farmacologico per il trattamento di diverse patologie psichiatriche (Beaulieu e Gainetdinov, 2011; Missale *et al.*, 1998). Alta densità di questi recettori è stata ritrovata nello striato, nel NAcc, nel tubercolo olfattorio ma anche nell'Hipp, nell'Amy e in regioni corticali (Beaulieu e Gainetdinov, 2011; De Mei *et al.*, 2009; Missale *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 2003). I neuroni che rilasciano DA originano dal mesencefalo e innervano diverse regioni corticali e subcorticali, in particolare attraverso le vie nigrostriatali, mesocorticali e mesolimbiche (Lewis e Sesack, 1997). Le vie

dopaminergiche neuronali del mesencefalo proiettano inoltre anche all'Hyp (Moore e Bloom, 1978).

1.4.2 *Ruolo del sistema dopaminergico nella regolazione del comportamento alimentare*

Il ruolo della DA nel comportamento alimentare si diversifica anche in base alle differenti vie dopaminergiche. La via nigrostriatale dopaminergica è associata con gli aspetti sensoromotori dell'alimentazione (Palmiter, 2007; Smith e Schneider, 1988). Le vie mesocorticali dopaminergiche invece sono implicate maggiormente nella risposta emotiva del comportamento alimentare (Volkow *et al.*, 2017). Le vie dopaminergiche mesolimbiche sono state associate con la motivazione e la gratificazione, e sono implicate nell'aspetto motivazionale dell'assunzione di cibo (Palmiter, 2007; Salamone e Correa, 2002; Smith e Schneider, 1988). Pertanto il sistema dopaminergico non riveste soltanto un ruolo nell'aspetto motivazionale legato al cibo per quanto sia l'aspetto più studiato visto l'importante ruolo del cibo come rinforzo naturale. Il sistema dopaminergico interagisce con diversi ormoni implicati nella regolazione del comportamento alimentare. Diversi studi dimostrano come nella VTA siano espressi i recettori per la leptina e per l'insulina e come questi recettori siano co-espressi con la tirosina idrossilasi, marker per i neuroni dopaminergici (Figlewicz *et al.*, 2003; Fulton *et al.*, 2006). La somministrazione IV di insulina porta ad un aumento dei livelli di mRNA del gene del trasportatore per la DA (DAT) e di conseguenza facilita la sua rimozione dalla sinapsi riducendo il segnale dopaminergico (Figlewicz *et al.*, 2003, 1994). La somministrazione di leptina IV a livello del NAcc invece, riduce i livelli extracellulari di DA (Krügel *et al.*, 2003).

Anche l'orexina possiede recettori sui neuroni dopaminergici e l'azione di questi recettori è simile a quelli della grelina, ma contrariamente a quest'ultimi la loro attivazione, nella VTA, non stimola l'assunzione di cibo; invece nel NAcc, stimola il rilascio di DA (Borgland *et al.*, 2006; Narita *et al.*, 2006; Sweet *et al.*, 1999). L'inattivazione della tirosina idrossilasi in topi transgenici, porta ad una deplezione di DA, il risultato di questa mancanza di neurotrasmettitore porta ad una soppressione dell'assunzione di cibo in modo simile a come quando viene lesionato il nucleo

ipotalamico LH (Szczyпка *et al.*, 1999). L'alterazione del segnale grelinico a livello della VTA porta ad una diminuzione dell'assunzione di cibo (Abizaid *et al.*, 2006).

1.4.3 Ruolo del sistema dopaminergico nella patologia dell'AN

Le vie mesolimbiche sono importanti anche nell'iperattività osservata nell'AN a causa del loro ruolo nella regolazione dell'attività locomotoria (Joyce e Koob, 1981; Koob e Swerdlow, 1988; Pijnenburg *et al.*, 1976). Inoltre, un'alterazione del sistema dopaminergico della gratificazione può essere importante nello sviluppo, nel decorrere e nel trattamento della patologia (O'Hara *et al.*, 2015).

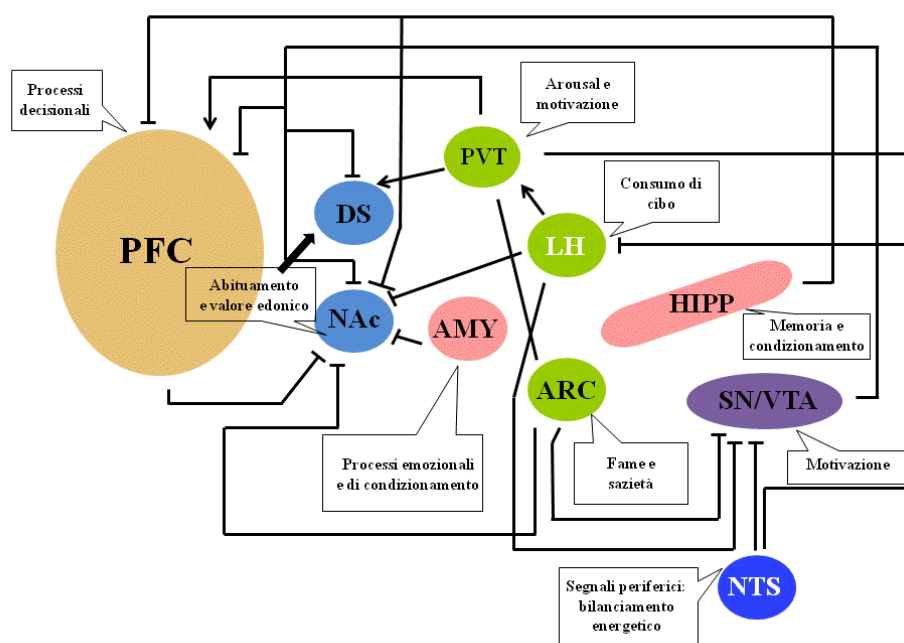


Figura 5. Sistema di *reward* dopaminergico. Rappresentazione schematica dei principali sistemi neuronali che controllano l'assunzione di cibo a livello centrale e le principali funzioni che ricoprono. Sono indicati inoltre alcuni dei circuiti principali che mettono in relazioni le principali aree cerebrali coinvolte negli aspetti legati all'assunzione di cibo. (Immagine riprodotta dal lavoro di: Volkow *et al.*, 2017).

Il sistema motivazionale dopaminergico comprende i neuroni dopaminergici dell'area tegmentale ventrale (VTA) che proiettano maggiormente verso il NAcc associato agli aspetti motivazionali ed all'apprendimento legato al rinforzo, verso i neuroni della substantia nigra (SN) che proiettano allo striato dorsale (DS) associati con i comportamenti legati alle scelte decisionali ed ai comportamenti legati alle abitudini (Howard *et al.*, 2017; Wise, 2009; Yager *et al.*, 2015). I neuroni dopaminergici della

VTA inoltre proiettano all'amigdala (Amy) all'ippocampo (Hipp) e alla PFC e quest'ultima costituisce un importante target attraverso il quale la via striatale diretta e indiretta modula le funzioni esecutive.

La restrizione alimentare in combinazione con un'intensa attività fisica può portare ad uno stato di stress ed ad un aumento dei livelli di cortisolo e CRF (Estour *et al.*, 2010; Gwirtsman *et al.*, 1989; Hotta *et al.*, 1986; Rojo *et al.*, 2006; Schorr *et al.*, 2015). Lo stress aumenta i livelli di DA attraverso il NAcc che risulta essere maggiormente attivato nei pazienti anoressici (Foerde *et al.*, 2015; Frank, 2014; Holly *et al.*, 2015; Keating *et al.*, 2012). L'elevata risposta dopaminergica, dovuta al rilascio massivo di CRF, dovrebbe sostenere e agevolare la ricerca di cibo (Stengel e Taché, 2014).

E' ormai nota l'associazione del sistema dopaminergico con i disordini alimentari e le comorbidità psichiatriche come ad esempio depressione, ansia, disordini compulsivi e comportamenti aggressivi (Jennings *et al.*, 2017; Martinussen *et al.*, 2017). Recenti studi hanno riportato alterazioni dopaminergiche nei pazienti con disordini alimentari (Berner *et al.*, 2017). Mediante l'uso della tomografia ad emissione di positroni (PET) si è potuto constatare un'attivazione dei recettori dopaminergici nello striato ventrale nei pazienti AN in fase di ricovero dalla patologia, mentre nella PFC, una diminuita attivazione in quei pazienti che sono ancora nella fase acuta (Frank *et al.*, 2005; Nagamitsu *et al.*, 2011). Negli adolescenti affetti da AN, dopo un periodo di malnutrizione e dopo un successivo periodo di recupero del peso corporeo, l'attivazione del sistema della ricompensa è intensificata (DeGuzman *et al.*, 2017). Queste alterazioni sono spesso correlate anche ad un'intensa attività fisica nei pazienti affetti da AN e BN (Hebebrand *et al.*, 2003b). Le concentrazioni nel liquido cerebrospinale (CSF) di pazienti anoressici, di DA e del suo metabolita acido omovanillico (HVA) sono normali (Gerner *et al.*, 1984) e in un altro studio invece risultano diminuiti (Gillberg, 1983; Kaye *et al.*, 1984). Pazienti in remissione della malattia in alcuni studi risultano avere bassi livelli di HVA mentre alcuni studi riportano un ritorno a livelli normali dopo il recupero del peso corporeo (Barbarich *et al.*, 2003; Kaye *et al.*, 1999, 1984). Nello stadio acuto della patologia i livelli plasmatici, in pazienti anoressici, di HVA e DA, risultano aumentati (Bowers *et al.*, 1994; D'Andrea *et al.*, 2009).

Anche le vie nigrostriatali sono altamente coinvolte nella regolazione del consumo di cibo, la somministrazione di DA in topi in cui è stata soppressa la sintesi, porta ad ipofagia e bradicinesia (Hnasko *et al.*, 2006). Molti studi si sono concentrati sul tentativo di utilizzare la grelina a fini terapeutici ma i risultati sono stati abbastanza diversi fra loro. La somministrazione di grelina è risultata efficace in alcuni pazienti anoressici (Kawai *et al.*, 2017) ma inefficace nell'aumentare l'appetito a causa dei livelli elevati di grelina presenti nel plasma (Miljic *et al.*, 2006). In animali da laboratorio, più precisamente nei ratti, la somministrazione di grelina aumenta il consumo di cibo e il rilascio di DA (Abizaid *et al.*, 2006; Kawahara *et al.*, 2009). Per la sua azione sul sistema dopaminergico mesocortoclimbico, la grelina previene nei topi l'instaurarsi del modello activity-based anorexia (ABA) (Legrand *et al.*, 2016). Anche la leptina è coinvolta nei circuiti dopaminergici di *reward* e nell'aspetto edonico dell'assunzione di cibo, riducendo nei topi il rilascio di orexina nel nucleo LH e diminuendo il rilascio di DA nel NAcc (Laque *et al.*, 2015). La leptina modula negativamente i meccanismi alla base della ricompensa data dall'assunzione di cibo (Louis *et al.*, 2010). Alla luce di questo, le proiezioni dopaminergiche dalla VTA al NAcc sono essenziali sia per regolare la risposta di grelina e leptina nel controllo della gratificazione indotta dall'assunzione di cibo, dimostrando che l'integrazione dei segnali della VTA risulta essere molto fine e complessa e che quest'area è fondamentale tra quelli che sono i target farmacologici nella cura dei disordini alimentari (Skibicka *et al.*, 2013).

1.4.4 *Il sistema endocannabinoide*

Il sistema endocannabinoide è composto da due recettori accoppiati alla proteina G (GPCRs), CB1 e CB2, e da due principali ligandi lipidici endogeni: N-arachidonoiletanolamina (anandamide, AEA) e il 2-arachidonoil-glicerolo (2AG). Il sistema endocannabinoide è un sistema di segnale pleiotropico ed è coinvolto nella regolazione di molteplici funzioni fisiologiche e neurobiologiche nei mammiferi, per queste ragioni rappresenta un importante bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche (Tam *et al.*, 2018). Oltre ai due più conosciuti endocannabinoidi, 2AG ed AEA, esistono anche altri cannabinoidi endogeni l' O-arachidonil-etanolamina (Virodamina), l'N-arachidonil-DA (NADA), l'Oleamide (OA), l'N-oleoiletanolamina

(OEA) e l’N-palmitoiletanolamina (PEA) (Simon e Cota, 2017). Il sistema endocannabinoide è distribuito in molteplici aree cerebrali coinvolte nel controllo motorio, in aree cognitive e deputate alla risposta emotiva, al comportamento motivato e all’omeostasi energetica. La sua distribuzione non è limitata solo alle aree cerebrali ma è localizzato anche in periferia, nella muscolatura scheletrica, nelle cellule miocardiche, nel tratto gastro-intestinale, nel tessuto osseo, nel fegato e nel sistema immunitario (Bisogno *et al.*, 1999).

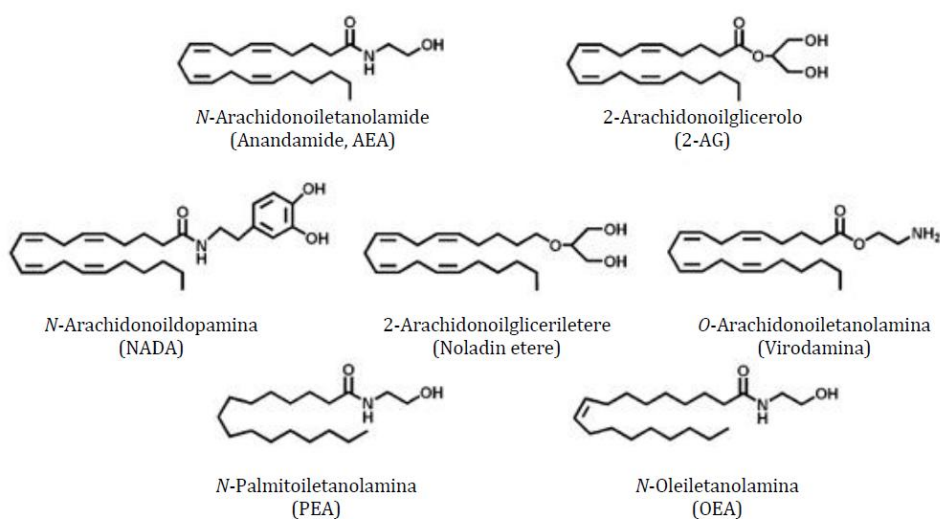


Figura 6. Formula di struttura degli endocannabinoidi (internet).

I recettori CB1 e CB2 sono ampiamente diffusi sia a livello del SNC che in periferia. Il recettore CB1 è codificato dal gene *Cnr1* ed è espresso in molte aree cerebrali ma in diverse concentrazioni: lo troviamo espresso in maniera minore nel bulbo olfattivo, nel cervelletto, nell’Hipp, nei gangli della base, nella corteccia e nell’Amy, nel talamo e nell’Hyp (Herkenham *et al.*, 1990). Il recettore CB1 è presente anche negli astrociti, e in altre cellule non neuronali dove, una volta attivato, promuove il rilascio di neurotrasmettitore (Stella, 2010). Il recettore CB1 è espresso non solo a livello centrale ma anche abbondantemente in quello periferico come anche nei vari tessuti (Mackie, 2005). Il recettore è largamente espresso nel tratto gastrointestinale (GI) come nelle cellule enteroendocrine, in quelle immunitarie e negli enterociti. Proprio nel tratto GI il recettore modula la motilità gastrica, la secrezione di acidi grassi, di fluidi, di neurotrasmettitori e ormoni, e agisce sulla permeabilità dell’epitelio intestinale (Izzo e

Sharkey, 2010). Inoltre, un altro ruolo importante, è il controllo dell'appetito e del dispendio energetico sia a livello ipotalamico, quindi centrale, ma anche nel tratto GI (Miller e Devi, 2011). A livello periferico il recettore CB1 è espresso nel tessuto adiposo, nel muscolo scheletrico, nelle ossa, nella pelle, a livello oculare, nel sistema riproduttivo e in cellule cancerogene di vario tipo (Montecucco e Di Marzo, 2012).

Il recettore CB2 mostra un omologia di sequenza del 44% con il recettore CB1 e la sua funzione è legata a quest'ultimo in diversi sistemi di neurotrasmissione (Munro *et al.*, 1993). La distribuzione di questo recettore nel cervello è inferiore rispetto al recettore CB1 ma al contrario, è presente in alta concentrazioni nella microglia e negli astrociti (Demuth e Molleman, 2006). È stato dimostrato come questi recettori siano presenti abbondantemente nel sistema immunitario, soprattutto nei monociti e nei macrofagi e nelle cellule B e T. La loro attivazione porta ad una riduzione del rilascio di citochine pro-infiammatorie e di fattori linfo-angiogenici (Cluny *et al.*, 2012). I recettori CB2 sono presenti in altri organi coinvolti nella risposta immunitaria come la milza, le tonsille e il timo. Il recettore CB2 è inoltre espresso nei neuroni piramidali della corteccia prefrontale dove modulano l'eccitabilità neuronale attraverso la regolazione dei canali ionici al calcio (den Boon *et al.*, 2012).

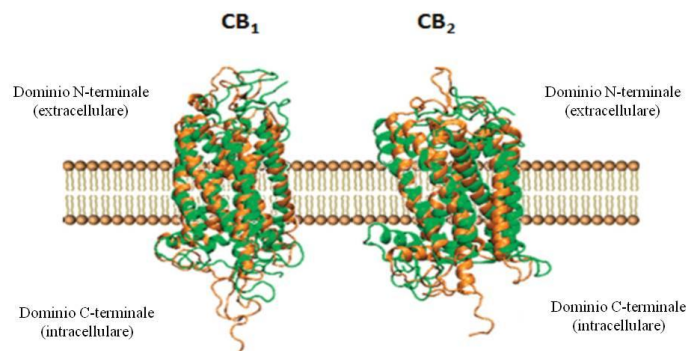


Figura 7. Struttura dei recettori CB1 e CB2
(<https://www.kalapa-clinic.com/en/cannabinoid-receptors/>).

La scoperta e la clonazione dei due principali recettori cannabinoidi ha fatto subito presupporre l'esistenza di ligandi endogeni detti appunto endocannabinoidi: il 2AG e l'AEA (Devane *et al.*, 1992; Di Marzo *et al.*, 1994; Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Mentre l'AEA è un agonista parziale dei recettori per gli EC, il 2-AG si rivelò essere un agonista completo per entrambi i recettori CB1 e CB2 e i livelli nel SNC erano nettamente maggiori rispetto all'AEA (Di Marzo e De Petrocellis, 2012; Pertwee, 2010). Entrambi i due principali endocannabinoidi mostrano differenze significative nell'affinità recettoriali ma entrambi son prodotti *on demand* in risposta ad un aumento della concentrazione intracellulare di calcio (Katona e Freund, 2008). Nelle figure 8 e 9 sono raffigurate le due vie che descrivono la biosintesi dell'AEA e del 2AG. Nella figura 10 viene rappresentata invece l'idrolisi dei due endocannabinoidi da parte degli enzimi di degradazione.

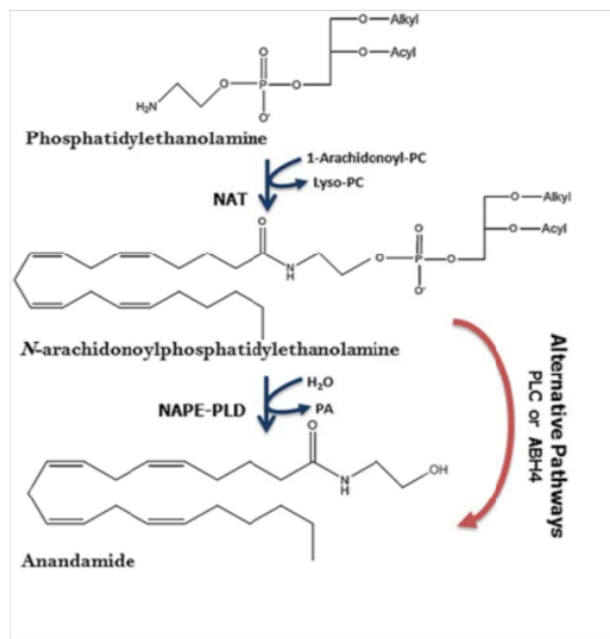


Figura 8. Biosintesi AEA (Fonseca *et al.*, 2013).

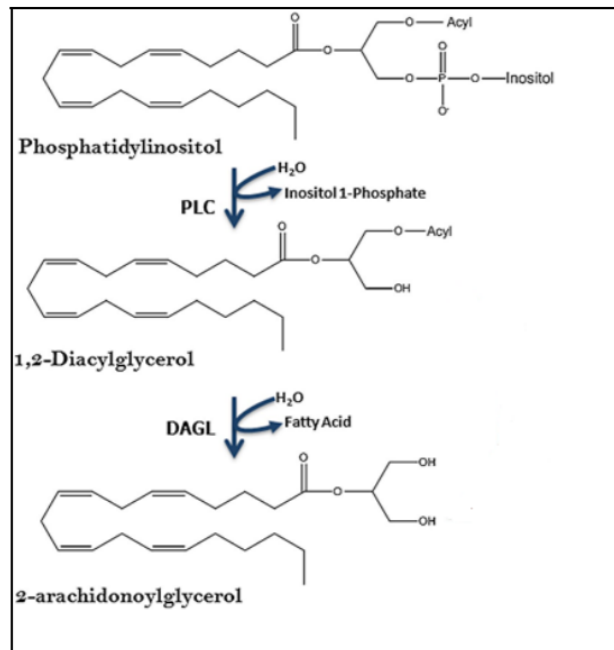


Figura 9. Biosintesi 2AG (Fonseca et al., 2013).

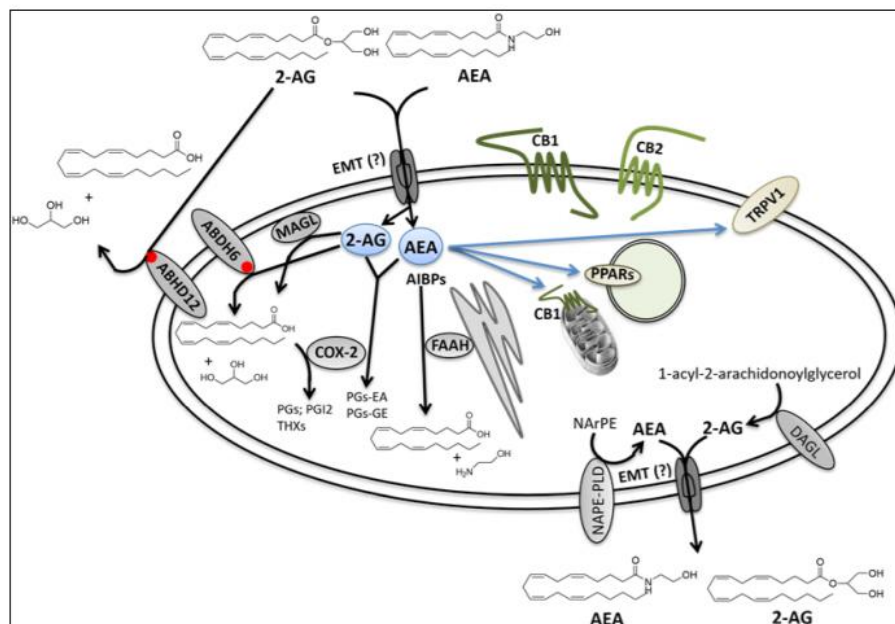


Figura 10. Degradazione AEA e 2AG. (Internet)

Nella figura 11 sono riportati i numerosi ruoli fisiologici che il sistema endocannabinoide ricopre all'interno dell'organismo umano. I recettori cannabinoidergici sono localizzati in regioni cerebrali coinvolte nella modulazione del dolore, dello stress e delle emozioni quali Amy e PFC (Herkenham *et al.*, 1991; Tsou *et*

al., 1998). Lo stress e la paura aumentano i livelli di endocannabinoidi nelle aree citate (Carrier *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2009; Hohmann, 2002).

Gli endocannabinoidi, endogeni, naturali o sintetici, hanno un importante effetto sull'attività motoria. Il THC è in grado di ridurre l'attività motoria spontanea se somministrata a dosi basse mentre a dosi intermedie causa invece un aumento che viene completamente annullato se somministrato a dosi elevate causando catalessia nei topi.

La modulazione del sistema endocannabinoide è in grado di potenziare o meno differenti fasi dell'apprendimento e della memoria. L'Hipp, area maggiormente coinvolta nei processi di apprendimento e memoria, è caratterizzata da un'alta densità di recettori CB1. L'uso prolungato di cannabis produce effetti sulla memoria a breve termine simili a quelli che si riscontrano in pazienti affetti da Alzheimer (AD) con degenerazione ippocampale.

Un altro importante ruolo del sistema endocannabinoide è quello antiemetico. A livello centrale, le aree coinvolte nel controllo della nausea e del vomito sono il bulbo e l'area postrema. I recettori CB1 sono ampiamente distribuiti nelle aree deputate al controllo dell'emesi e della nausea come anche la loro localizzazione nei neuroni noradrenergici, dopaminergici e altri disposti in aree deputate al controllo di nausea e vomito (Calignano *et al.*, 1998; Di Marzo *et al.*, 2001). La cannabis previene nausea e vomito ed è usata come antiemetico in pazienti sottoposti a chemioterapia.

Sempre più evidenze scientifiche associano anche un ruolo neuro-protettivo e anti-infiammatorio al sistema endocannabinoide in risposta a stimoli dannosi che il cervello riceve. Ad esempio, è stato visto che i livelli di 2AG risultano aumentati in seguito a trauma cerebrale e la conseguente somministrazione di 2AG attenua gli effetti neuropatologici dovuti al trauma (Panikashvili *et al.*, 2001).



Figura 11. Ruoli fisiologici del sistema endocannabinoide (internet).

1.4.5 *Ruolo del sistema endocannabinoide nel comportamento alimentare*

Il ruolo dei cannabinoidi come modulatori dell'assunzione di cibo sia nei roditori che nell'uomo è ormai stato confermato da numerose evidenze. Il controllo sia dell'assunzione di cibo ma anche del dispendio energetico da parte del sistema endocannabinoide è confermato dalla presenza dei recettori CB1 sia nell'Hyp ma anche nel sistema limbico, dimostrando inoltre che i cannabinoidi hanno un ruolo centrale nell'aspetto edonico legato all'assunzione di cibo (Silvestri e Di Marzo, 2013). A livello ipotalamico il sistema endocannabinoide modula l'alimentazione riducendo i segnali di sazietà e potenziando invece quelli oressigenici. Inoltre, come accennato sopra, mediante l'interazione con il sistema mesolimbico, i cannabinoidi sono in grado di potenziare l'aspetto motivazionale che porta al consumo di cibo intensificando il piacere dovuto al consumo del cibo stesso (Kirkham, 2003). L'Hyp è, al livello centrale, l'area che integra i segnali periferici provenienti dal tessuto adiposo e dal tratto GI quindi ricopre un ruolo fondamentale nel comportamento alimentare (Cota, 2008). Nonostante i recettori CB1 non siano espressi in alte concentrazioni a livello ipotalamico, la loro attivazione è in grado di produrre effetti molto importanti (Breivogel e Childers, 1998).

Un'alterazione del sistema endocannabinoide a livello centrale comporta spesso un aumento dell'assunzione di cibo e porta ad obesità (Engeli *et al.*, 2008; Mazier *et al.*,

2015). In particolare, la stimolazione dei recettori CB1 conduce ad un aumento del consumo di cibo e sono considerati un importante target farmacologico per il trattamento dei disturbi alimentari come l'anoressia (Aigner *et al.*, 2011; Reuter e Martin, 2016; Williams e Kirkham, 1999). La somministrazione a basse dosi di agonisti CB1 incrementa l'assunzione di cibo nei topi, mentre dosi moderate ed elevate ne causano una diminuzione. L'iperfagia indotta da stimolazione dei recettori CB1 è dovuta alla soppressione della trasmissione glutamatergica; al contrario, l'ipofagia CB1-mediata è dovuta alla riduzione di quella GABAergica (Bellocchio *et al.*, 2010; Busquets Garcia *et al.*, 2016). Il rimonabant (SR141716A) (Acomplia®, Sanofi-Aventis), antagonista recettoriale dei CB1, riduce l'assunzione di cibo portando ad ipofagia (Bennetzen, 2011).

È stato dimostrato come l'mRNA dei recettori CB1 sia co-localizzato con ormoni ipotalamici essenziali per la regolazione dell'assunzione di cibo, come CRH, CART ed MCH sostenendo quindi l'ipotesi che il sistema EC è in grado di interagire con i sistemi ormonali importanti nei circuiti che regolano fame e sazietà (Cota *et al.*, 2003). La somministrazione diretta di AEA nel VMH dell'Hyp, con l'attivazione dei recettori CB1, porta ad un aumento dell'assunzione di cibo, i livelli ipotalamici di endocannabinoidi variano in risposta allo stato nutrizionale, in base al tipo di cibo consumato o allo stato ormonale (Di Marzo *et al.*, 2001; Jamshidi e Taylor, 2001; Kirkham, 2003; Kola *et al.*, 2008; Ramírez-López *et al.*, 2015). La somministrazione di agonisti CB1 in topi non sottoposti a restrizione ma al contrario alimentati e quindi sazi, ha indotto iperfagia attraverso l'attivazione dei neuroni POMC che sono invece implicati nel fermare l'assunzione di cibo confermando un tipo di attivazione dose dipendente (Gómez del Pulgar *et al.*, 2000; Koch, 2017; Koch e Horvath, 2014). L'inibizione dei recettori CB1 tramite il rimonabant causa una riduzione dei livelli di NPY e questo indica che i neuroni AgRP/NPY sono controllati dagli endocannabinoidi (Verty *et al.*, 2009). I neuroni che esprimono AgRP/NPY non contengono recettori CB1 ma questi sono presenti nelle terminazioni GABAergiche che innervano questi neuroni (Morozov *et al.*, 2017). Il rimonabant è inoltre in grado di diminuire l'aumento dei livelli di grelina in ratti digiuni, mentre i livelli plasmatici di questo ormone nei ratti non a digiuno trattati con un agonista sono più bassi rispetto ai controlli trattati con veicolo (Cani *et al.*, 2004).

La grelina è in grado di inibire gli impulsi sinaptici eccitatori nel nucleo PVN e questo effetto viene soppresso dalla somministrazione dell'AM251 e mediante inibizione della sintesi di endocannabinoidi (Kola *et al.*, 2008). Ulteriori evidenze dimostrano come la modulazione del sistema endocannabinoide possa avere ripercussione sul consumo di cibo, infatti la somministrazione locale o sistemica di cannabinoidi esogeni come il THC, il CP55940 ed il WIN 55212-2, ed endogeni come AEA e 2AG aumentano il consumo di cibo sia nell'uomo che in animali da laboratorio (Cota *et al.*, 2003; Hollister, 1971; Williams e Kirkham, 1999a).

Le droghe d'abuso ed i cibi palatabili mostrano similitudini per quanto riguarda la stimolazione dei circuiti della gratificazione che sono alla base delle dipendenze sia negli animali che nell'uomo. Le droghe infatti attivano regioni specifiche deputate alla ricompensa come i circuiti dopaminergici. Il sistema endocannabinoide svolge un ruolo modulatorio a livello centrale sia per quanto riguarda il consumo di cibo che il dispendio energetico, ma non solo, svolge un ruolo fondamentale nei processi di gratificazione e nell'aspetto edonico legato al cibo (de Kloet e Woods, 2009; Di Marzo e Matias, 2005; Lau *et al.*, 2017).

Topi knockout per il recettore CB1 mostrano ipofagia e perdita di massa corporea rispetto ai topi wild-type (Cota *et al.*, 2003a; Ravinet Trillou *et al.*, 2004; Sanchis-Segura *et al.*, 2004). Le cause che stanno alla base dell'iper o ipofagia, indotte dalla modulazione del tono endocannabinoide, non sono ancora del tutto chiare.

Nel sistema mesocorticolimbico gli endocannabinoidi hanno un ruolo importante, infatti la somministrazione di 2AG ed AEA nel NAcc porta a iperfagia e questa condizione può essere revertita attraverso gli antagonisti del recettore CB1 (Kirkham *et al.*, 2002; Mahler *et al.*, 2007; Soria-Gómez *et al.*, 2007). Inoltre la somministrazione sistemica di AEA porta ad un rilascio di DA nel NAcc che viene invece attenuato dagli antagonisti CB1 durante la somministrazione di un cibo nuovo e palatabile (Melis *et al.*, 2007; Solinas *et al.*, 2006). Questo dimostra che il rilascio di DA stimolato da cibi palatabili, nel NAcc, è legato e modulato dal sistema endocannabinoide. Il sistema endocannabinoide media gli aspetti legati al piacere dovuto ad un cibo palatabile ed esercita questa funzione mediante la sua azione a livello della Shell del NAcc (Di Chiara e Bassareo, 2007).

La somministrazione sistemica di THC a basse dosi induce negli animali un aumento del consumo di cibo palatabile rispetto a quello normale. Non solo, tra i vari tipi di pellet palatabile a disposizione, gli animali prediligono quello con un alto contenuto di soli grassi rispetto a quello ricco in grassi e in zucchero (Koch e Matthews, 2001; Williams *et al.*, 1998; Williams e Kirkham, 1999a). Questo effetto è stato visto anche per quanto riguarda soluzioni contenenti saccarosio, la somministrazione di THC ne aumenta il consumo da parte degli animali trattati e questo effetto sembra mediato dai recettori CB1 in quanto il pre-trattamento con il rimonabant inverte l'effetto. Inoltre è stato dimostrato che il trattamento con THC può ridurre l'avversione verso i gusti amari o verso cibi poco palatabili (Jarrett *et al.*, 2007).

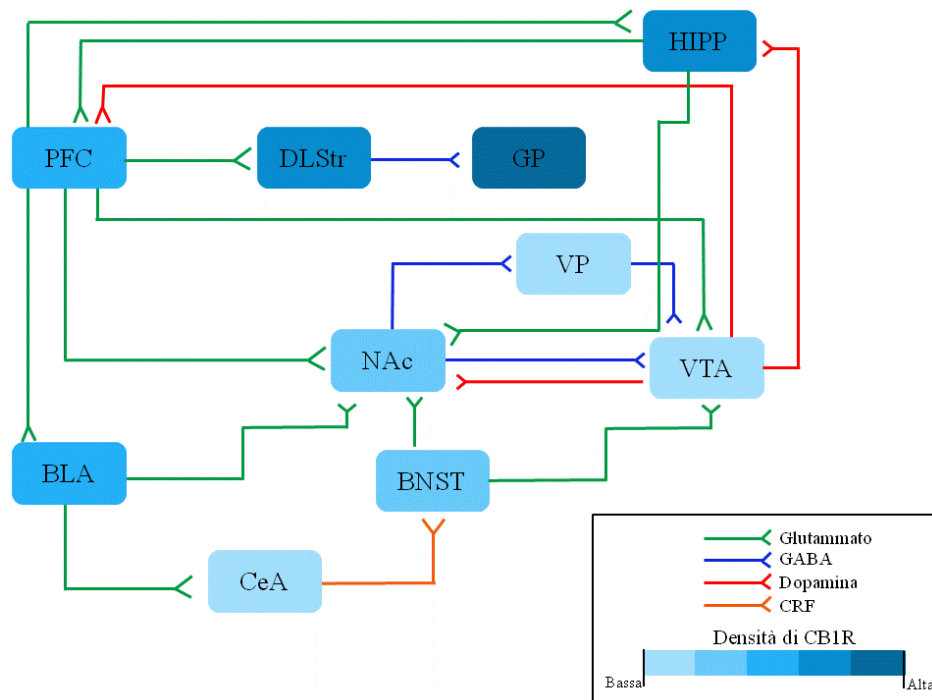


Figura 12. Riproduzione schematizzata dei meccanismi del segnale del sistema endocannabinoide nei circuiti cerebrali legati alla ricompensa. I recettori CB1 sono espressi in tutte le aree legate al *reward* come ad esempio l'amigdala basolaterale (BLA), la PFC, l'HIPP, il pallidum ventrale (VP), il globo pallido (GP), lo striato dorsolaterale (DLStr), il NAcc, l'area tegmentale ventrale (VTA), nucleo del letto della stria terminale (BNST) e nucleo centrale dell'amigdala (CeA). In generale, l'espressione degli enzimi come NAPE-PLD e DAGL α o ad esempio gli enzimi di degradazione FAAH e MAGL sono abbastanza simili a quelli del recettore CB1 nelle regioni raffigurate nello schema. Nell'Amy, l'espressione del recettore CB1 e degli enzimi MAGL e FAAH è elevata nei nuclei laterali e basolaterali con minore espressione nel nucleo centrale. Anche nello striato dorsale troviamo un'elevata espressione di

CB1 e di DAGL α , con un gradiente laterale mediale abbastanza simile fra recettore ed enzima, con una maggiore espressione nella parte laterale. Nel NAcc osserviamo una minore espressione del recettore CB1, di DAGL α e dell'enzima FAAH, e nonostante una diminuita espressione del recettore CB1 nei neuroni dopaminergici del NAcc, l'enzima DAGL α è invece espresso sia nelle cellule dopaminergiche che in quelle non dopaminergiche (Parsons e Hurd, 2015). Figura riprodotta da Parsons e Hurd, 2015.

1.4.6 *Ruolo del sistema endocannabinoide nella patologia dell'anoressia nervosa*

Visto l'importante ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione dell'omeostasi energetica e del consumo calorico, molti studi hanno messo in evidenza una correlazione tra sistema endocannabinoide e patologie legate all'alimentazione come appunto l'AN. È stato dimostrato che in pazienti anoressiche è presente una disfunzione del tono del sistema endocannabinoide ed anche un'alterazione nella trascrizione dei recettori per gli endocannabinoidi. Tutte queste evidenze hanno reso questo sistema neurotrasmettitoriale di notevole interesse per lo studio di nuovi target farmacologici per il trattamento dei disturbi alimentari. Il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nell'eziopatogenesi dell'AN è stato ampiamente dimostrato e diversi studi sostengono che una sua disregolazione sia alla base anche di altri disturbi alimentari, come il BED e l'obesità. I livelli plasmatici di AEA nei pazienti anoressici risultano notevolmente aumentati ma non sono state riscontrate modifiche nei livelli circolanti di 2AG (Monteleone *et al.*, 2005). I pazienti affetti da AN mostrano bassi livelli di leptina plasmatica e dati gli alti livelli di AEA circolanti, è stata ipotizzata una correlazione inversa tra i due suggerendo l'ipotesi che la leptina abbia un effetto negativo sulla produzione di endocannabinoidi (Di Marzo *et al.*, 2001).

A livello recettoriale, è stato visto un aumento dell'mRNA codificante per il recettore CB1 nel plasma di pazienti affetti da AN rispetto ai controlli sani (Frieling *et al.*, 2009). Mediante studi di PET in pazienti malati è stato visto un aumento dei recettori CB1 in determinate aree cerebrali come l'insula e la corteccia frontale e temporale (Gérard *et al.*, 2011). Sempre a livello genetico sono stati trovati dei polimorfismi a singolo nucleotide nei geni codificanti sia per il recettore CB1 ma anche per l'enzima FAAH che degrada l'AEA (Monteleone *et al.*, 2009). Questa disregolazione del tono del sistema endocannabinoide potrebbe essere una risposta omeostatica adattativa messa in atto dall'organismo per far fronte al bisogno energetico aumentando il senso della fame e l'assunzione di cibo.

Esperimenti in vivo attraverso l'uso della PET e del radioligando [18F]MK-9470 mostrano un aumento della densità dei recettori CB1 in pazienti anoressiche rispetto ai controlli sani. Questo aumento è stato riscontrato nella regione corticale e subcorticale del cervello. Un ulteriore aumento della disponibilità recettoriale dei CB1 è stata indicata nelle zone insulari della corteccia anche nei pazienti affetti da BN. Quest'area è strettamente legata ai processi gustativi, alla gratificazione e alle emozioni in quanto è un centro di integrazione di questi specifici segnali (Gérard *et al.*, 2011).

Studi preclinici effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato come il trattamento subcronico con l'agonista naturale per i recettori cannabinoidi CB1/CB2, il THC, e con l'agonista sintetico CP-55,940 riducono significativamente la perdita di peso corporeo e l'attività sulla ruota nei ratti sottoposti al modello di anoressia ABA (Scherma *et al.*, 2017).

Sempre nel modello ABA, è stato messo in evidenza, nei ratti, un aumento dei recettori CB1 in zone corticali e subcorticali che ritornano ai valori basali dopo il recupero del peso corporeo. Questi risultati sono stati ottenuti per la prima volta in vivo mediante la tecnica della PET (Casteels *et al.*, 2014). Un miglioramento dei sintomi ABA è stato osservato dopo la somministrazioni di THC e dell'inibitore del reuptake per gli endocannabinoidi, OMDM-2 ((S)-N-oleoil-(10-idrossibenzil)-20-etanolamina). La somministrazione di THC alla concentrazione di 0.5 mg/kg era in grado di aumentare l'assunzione di cibo ma non aveva effetti sul peso corporeo e sull'attività fisica. Nonostante gli animali avessero ripreso una corretta alimentazione, mostravano però un alto tasso di mortalità dovuto probabilmente all'effetto del THC che induce ipotermia, in aggiunta ai deficit di termoregolazione indotti dal modello ABA causati dalla restrizione alimentare. La somministrazione di OMDM-2, che inibisce la ricaptazione dell'AEA, aumenta i livelli cerebrali di AEA e 2AG (de Lago *et al.*, 2005). Questo tipo di trattamento non era comunque in grado di agire sul peso corporeo pur aumentando l'assunzione di cibo, e nessun effetto è stato riscontrato per quanto riguarda gli RWA giornalieri (Lewis e Brett, 2010). Il trattamento sub-cronico con il THC, 2 mg/kg, in ratti femmina sottoposte al protocollo ABA, era in grado di attenuare la perdita di peso corporeo stimolando il consumo di cibo e mostrando un moderato effetto sull'attività fisica. L'effetto del THC sui sintomi ABA era molto più evidente quando veniva introdotto nella dieta un cibo altamente appetibile. La combinazione di entrambi

portava ad un effetto positivamente marcato sul bilanciamento energetico con una riduzione del consumo energetico, della lipolisi e della termogenesi (Verty *et al.*, 2011). In ratti sottoposti a restrizione alimentare, Avraham e collaboratori hanno valutato i possibili effetti sul funzionalità cognitive, sul consumo di cibo e sui livelli di alcuni neurotrasmettitori nell'Hipp e nell'Hyp. Gli animali sono stati trattati con 0.1 mg/kg di 2AG coadiuvato da altri due composti il 2-palmitoilglicerolo e 2-linoleiglicerolo, detti composti di "entourage" che lo proteggono dalla degradazione, prolungando l'effetto farmacologico. Il trattamento con il 2AG da solo era in grado di aumentare il consumo di cibo e questo effetto era maggiore quando il 2AG veniva somministrato insieme ai composti di entourage. La somministrazione del composto SR141716A, un antagonista dei recettori CB1, ribaltava questo effetto positivo sul cibo causato dal trattamento con 2AG insieme ai composti di entourage. Un effetto positivo dopo la somministrazione di 2AG insieme ai composti di entourage, si è visto anche dal punto di vista cognitivo, e si assiste anche ad un aumento dei livelli di norepinefrina (NE), DA e L-DOPA nell'Hipp. Anche in questo caso i sintomi sono stati revertiti mediante il trattamento con SR141716A con una normalizzazione nei livelli di NE e L-DOPA. L'uso di basse dosi di 2AG insieme ai composti di entourage sembra quindi migliorare le funzioni cognitive grazie all'aumento di NE e L-DOPA nell'Hipp e questo aspetto è molto importante perché potrebbe risultare un efficace trattamento nei pazienti anoressici con deficit di tipo cognitivo (Avraham *et al.*, 2017).

1.5 Trattamenti farmacologici nell'AN

Ad oggi il trattamento per i disturbi alimentari è multidimensionale e include la psicoterapia, la riabilitazione nutrizionale e non meno importante, l'uso di farmaci. Tutt'oggi non esiste una terapia farmacologica di elezione per far fronte alle caratteristiche cliniche della patologia. La fluoxetina e la lisdexamfetamina sono le uniche terapie approvate dall'agenzia del farmaco (AIFA) per il trattamento rispettivamente di BN e BED. Numerosi trial clinici stanno sperimentando l'uso di antipsicotici, antidepressivi e stabilizzanti dell'umore, inibitori della ricaptazione della 5HT o della norepinefrina.

Per quanto riguarda l'AN una classe di farmaci che spesso viene utilizzata è quella degli antipsicotici, in grado di bloccare i recettori dopaminergici (Miller, 2009).

Questi farmaci vengono usati per ridurre le comorbidità psichiatriche come l'alterazione della propria immagine, paura di prendere peso, comportamenti ossessivi compulsivi, ipervigilanza e agitazione (Powers e Santana, 2004). Questa classe di farmaci nei pazienti affetti da schizofrenia e disturbo bipolare, ha come effetto collaterale quello di aumentare l'appetito e di conseguenza incrementare il peso corporeo. Pertanto è stato valutato il loro utilizzo in pazienti anoressici ma i risultati non hanno sortito l'effetto atteso (Hay e Claudino, 2012; McKnight e Park, 2010). Gli antipsicotici di prima generazione non hanno dimostrato efficacia nel favorire l'aumento di peso, mentre quelli di seconda generazione come per esempio l'antagonista D2/5HT2 olanzapina sono più efficaci (Vandereycken, 1984). Questa categoria di antipsicotici si è visto migliorare i sintomi depressivi e ossessivo compulsivi ed ha un effetto importante nel ridurre l'"anorexic rumination" (Brewerton, 2012; Flament *et al.*, 2012). Antipsicotici come il risperidone, la quetiapina, aripiprazolo e ziprasidone non sono stati studiati a fondo per il trattamento dell'AN (Powers e Santana, 2004). L'olanzapina invece è molto efficiente nel ridurre i sintomi psichiatrici e questo aspetto porta anche a promuovere e supportare il recupero del peso corporeo, ma gli effetti extrapiramidali e i sintomi ad essi associati, come i problemi cardiaci, possono essere pericolosi nei pazienti anoressici. Il tandospirone o metanopirone è un agonista parziale selettivo per i recettori serotoninergici di tipo 1 ed agisce aumentando la neurotrasmissione colinergica e dopaminergica ippocampale e corticale. Questo farmaco viene usato per il trattamento di pazienti schizofrenici ma è stato visto essere efficace anche per i sintomi psicopatologici degli anoressici e utile per l'aumento di peso (Okita *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda gli antidepressivi che sono sicuramente utili per curare le comorbidità, la validità di questi farmaci per il trattamento dell'AN è molto bassa (Mischoulon *et al.*, 2011). Tra questa classe di farmaci, quella più usata è quella degli inibitori della ricaptazione del 5HT (SSRIs) come la fluoxetina, ma hanno una bassa efficacia nel promuovere il recupero del peso corporeo (Walsh *et al.*, 1991).

La D-cicloserina è un agonista parziale glutamatergico che agisce sui recettori NMDA (Henderson *et al.*, 1990). Questo farmaco viene utilizzato generalmente per il trattamento dei pazienti con disturbi ossessivo compulsivi. I pazienti anoressici riportano spesso fobie verso il cibo, paure generalizzate e disturbi ossessivo compulsivi.

È stata vista la sua efficacia nel mantenere il peso corporeo in seguito al recupero del BMI coadiuvato da sessioni di psicoterapia (Levinson *et al.*, 2015).

Il sistema endocannabinoide costituisce un possibile target farmacologico nella terapia dell'AN. L'agonista sintetico Dronabinol (THC sintetico) è stato utilizzato per il trattamento della perdita di appetito nella waste syndrome, della nausea e del vomito in pazienti con tumore e vista la sua efficacia per questi sintomi, di recente è stato proposto come possibile farmaco per il trattamento dell'AN. Pazienti affette da AN cronica, hanno riportato un aumento seppur non elevato, di peso corporeo dopo il trattamento per 4 settimane con Dronabinol (Andries *et al.*, 2014). In un altro trial clinico dopo trattamento con Dronabinol, è stato visto un aumento del dispendio energetico associato ad un aumento dell'attività fisica, associato all'uso del farmaco, senza diminuzione del peso corporeo (Andries *et al.*, 2015).

Altro aspetto molto importante, come complicanza medica dell'AN è l'impatto che la malnutrizione può avere sulla massa ossea. Osteoporosi ed elevato tasso di fratture sono spesso associati alla patologia (Grinspoon *et al.*, 2000; Lucas *et al.*, 1999). Sono stati eseguiti diversi studi per poter contrastare questo aspetto con l'utilizzo di farmaci e ormoni. Ad esempio l'alendronato, aumenta la densità ossea in adolescenti anoressiche (Golden *et al.*, 2005), mentre l'applicazione di dispositivi transdermici che rilasciano estradiolo sono efficaci nel migliorare la densità ossea e nel contrastare sintomi come l'ansia e distorta percezione dell'immagine corporea soprattutto in pazienti anoressici adolescenti (Misra *et al.*, 2011, 2013).

1.6 L'epigenetica nei disturbi alimentari

Le alterazioni epigenetiche comprendono tutte quelle trasformazioni post-trascrizionali del DNA e delle proteine nucleari che poi hanno come conseguenza la modifica della struttura della cromatina (Levenson e Sweatt, 2005). Le modificazioni epigenetiche sono ereditabili e portano ad un'alterazione dell'espressione genica che non altera però la sequenza del DNA. I meccanismi che portano a variazioni epigenetiche possono essere divisi in metilazione del DNA, modificazioni istoniche posttraslazionali (acetilazione, metilazione, fosforilazione ecc.), cambiamenti nel posizionamento dei nucleosomi ed i microRNA (miRNAs). L'interazione fra tutti questi fattori è in grado di regolare l'espressione genica.

La metilazione del DNA implica l'aggiunta di un gruppo metile (-CH₃) in posizione 5' del residuo citosinico dell'anello pirimidinico, nella sequenza dinucleotidica 5'-CpG-3'. La metilazione dei residui citosinici avviene nelle isole dinucleotidiche CpG (CpG sites) frequenti nelle regioni promotrici del gene e rare nel genoma dei mammiferi (Esteller, 2008; Kim e Choi, 2015). Le isole CpG sono lunghe circa 200 paia di basi (bp) dove la presenza di GC (guanina e citosina) è più alta rispetto ad altre zone del genoma, circa 50% in più.

Le metilazioni a carico del DNA alterano la funzionalità dei geni e sono in grado di modulare l'espressione genica portando a diminuzione o aumento dell'espressione genica favorendo o meno il legame dei fattori di trascrizione del DNA. Durante lo sviluppo, la sequenza delle metilazioni del DNA nel genoma è modificata in risposta a nuove metilazioni e demetilazioni del DNA. Come risultato, diverse cellule sviluppano un pattern caratteristico di metilazioni che regola la trascrizione genica specifica di quel determinato tessuto (Moore *et al.*, 2013). Il processo di metilazione è catalizzato dalle DNA metiltransferasi (DNMTs) (Bird, 2002; Miranda e Jones, 2007). La metilazione delle isole CpG che sono colocalizzate in regioni promotrici o regolatorie sono in grado di reprimere la trascrizione genica. La metilazione in una specifica sequenza di DNA può inibire il legame di determinate proteine regolatorie bloccando l'attivazione del gene (Crider *et al.*, 2012).

Le modificazioni istoniche avvengono a carico di proteine dette appunto istoniche che si trovano nei nuclei delle cellule eucariotiche e che sono la componente strutturale della cromatina, formando con essa i nucleosomi. I nucleosomi sono costituiti da un centro proteico formato da otto proteine istoniche (Davey *et al.*, 2002). Questi istoni formano il core del nucleosoma attorno al quale il DNA si avvolge (Mariño-Ramírez *et al.*, 2005). Il core istonico è composto da un dominio ripiegato e da una coda N-terminale coinvolti nelle modificazioni post-traslazionali come la trascrizione, la ricombinazione e la riparazione del DNA e l'organizzazione dei cromosomi (Arents e Moudrianakis, 1995; ENCODE Project Consortium *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2007; Jenuwein e Allis, 2001; Krivtsov *et al.*, 2008; Luger *et al.*, 1997; Ruthenburg *et al.*, 2007). La parte N-terminale è soggetta a varie modifiche come l'acetilazione, la metilazione e la fosforilazione (Kouzarides, 2007; Ruthenburg *et al.*, 2007). L'acetilazione degli istoni è forse la prima modificazione epigenetica studiata (Feinberg

e Tycko, 2004; Ruthenburg *et al.*, 2007) e insieme alla deacetilazione costituiscono dei meccanismi chiave nella regolazione genica. Il processo di acetilazione e deacetilazione inizia quando una lisina del residuo N-terminale della coda istonica viene acetilata dalla istone deacetilasi (HDAC) (Jenuwein e Allis, 2001; Ruthenburg *et al.*, 2007). I residui di lisina contenenti una carica positiva si legano fortemente alla carica negativa del DNA compattando ulteriormente la struttura cromosomica della cromatina e bloccando l'accesso ai fattori di trascrizione. Le reazioni di acetilazione eliminano le cariche positive e causano un allentamento del legame tra proteine istoniche e DNA, quindi il nucleosoma assume una forma più rilassata rendendo possibile l'accesso dei fattori trascrizionali alle regioni promotrici. Questo rilassamento della struttura cromatinica può essere revertito dall'azione delle HDAC. L'iperacetilazione istonica è il principale meccanismo epigenetico che è in grado di modulare, attivando e regolando, la trascrizione genica agendo sulla struttura della cromatina o richiamando altri fattori associati alla cromatina (Feinberg e Tycko, 2004; Jenuwein e Allis, 2001; Ruthenburg *et al.*, 2007).

La metilazione istonica è l'aggiunta, da parte di una istone metiltransferasi di uno, due o tre gruppi metili dal donatore di gruppi metilici AdoMet ad un residuo di lisina o arginina delle proteine istoniche. La metilazione è un processo regolato da una metiltransferasi e da una istone demetilasi. La metilazione istonica è responsabile dell'attivazione e inattivazione trascrizionale incluso il silenziamento di regioni nel genoma (ENCODE Project Consortium *et al.*, 2007; Jenuwein e Allis, 2001). Questa modificazione ha diversi effetti sulla funzionalità genica (Berger, 2007; Guenther *et al.*, 2007; Miao e Natarajan, 2005). Nelle regioni attive del gene, la metilazione istonica si verifica in abbondanza e a seconda dei siti in cui avviene è associata con un'inattivazione o silenziamento genico (Kouzarides, 2007; Miranda e Jones, 2007; Ruthenburg *et al.*, 2007).

I miRNAs sono una classe di RNA non codificanti che svolgono un ruolo molto importante nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale, ma non solo, regolano molte funzioni sia fisiologiche che fisiopatologiche come ad esempio nelle malattie cardiovascolari e nella carcinogenesi (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2011). I miRNA sono in grado di individuare i geni responsabili delle vie epigenetiche regolatorie e contribuire a

sostenere i processi di metilazione del DNA. Diversi miRNA sono in grado di modificare la struttura cromatinica agendo ad esempio sulle proteine HDAC. Una disregolazione dell'espressione dei miRNA può tradursi in una sovra-espressione delle HDAC in cellule cancerogene (Sato *et al.*, 2011).

Lo studio delle modificazioni epigenetiche nei disturbi alimentari è molto importante per poter valutare quali possono essere i fattori di rischio, come per esempio uno stress di tipo materno, un'errata nutrizione durante la gestazione; inoltre i cambiamenti epigenetici possono essere associati con il sesso e con eventi traumatici in età puberale. Molti studi epigenetici su pazienti con disturbi alimentari si sono concentrati sulle metilazioni del DNA in tessuti periferici come il sangue. Questo anche perché è più semplice poterlo raccogliere rispetto ad altri tessuti, come nel caso del cervello. Non solo il tipo di alimentazione che la madre assume durante la gestazione è in grado di influenzare i cambiamenti epigenetici, ma anche il tipo di nutrienti che si assumono in età adulta possono svolgere un ruolo importante nello sviluppo di patologie psichiatriche e disturbi alimentari (Crider *et al.*, 2012; McGowan *et al.*, 2008; Yilmaz *et al.*, 2014). Alcuni macronutrienti come la vitamina B12, l'acido folico e la colina, sono in grado di influenzare l'attività delle metiltransferasi implicate nelle reazioni di metilazione del DNA (Vanhees *et al.*, 2014). La carenza di acido folico e vitamina B12 è in grado di influenzare la metilazione del DNA in vari stadi della vita, dalla nascita all'età adulta (Anier *et al.*, 2013; Day e Sweatt, 2010; Tian *et al.*, 2012). Nell'animale la carenza nella dieta di acido folico porta ad un aumento della metilazione nelle cellule nervose (Baker-Andresen *et al.*, 2015). L'acido folico insieme alla riboflavina, alla metionina ad esempio sono in grado di agire sul donatore di gruppi metilici AdoMet (Stefanska *et al.*, 2012). Il folato, la forma idrosolubile della vitamina B9 ha un ruolo importante nella sintesi, riparazione e metilazione del DNA. Una volta assunto con la dieta il folato viene convertito in tetraidrofolato che è associato alla trasformazione dell'omocisteina in metionina (Scott e Weir, 1998; Selhub, 2002). La metionina è un precursore del donatore AdoMet che garantisce i gruppi metile per la maggior parte delle reazioni di metilazione (Waterland, 2006).

Di recente gli studi di epigenetica si sono rivolti e concentrati su geni candidati e sulle metilazioni che avvengono nelle zone promotrici di questi geni coinvolti nei disturbi alimentari. I geni legati al sistema dopaminergico sono di grande interesse in

quanto correlati con i sistemi della gratificazione. È stato visto, in pazienti anoressiche, un'elevata espressione dell'mRNA del trasportatore dopaminergico DAT. Questo aumento dell'mRNA è dovuto ad una ipermetilazione della regione promotrice del gene. È stata trovata anche una ipermetilazione del gene promotore per il recettore D2 sempre in pazienti anoressici (Frieling *et al.*, 2010).

Un altro gene candidato è quello relativo a POMC, ormone che regola l'appetito. Un studio ha dimostrato, in donne anoressiche in fase acuta, donne in fase di recupero e soggetti sani, che l'espressione dell'mRNA di POMC era correlato in modo significativo ai livelli di leptina ed era maggiormente elevato nelle pazienti anoressiche in fase acuta piuttosto che negli altri due gruppi sperimentali (Ehrlich *et al.*, 2010).

In pazienti anoressici è stata individuata una ipermetilazione del gene dell'alfa-sinucleina e del gene codificante per il peptide natriuretico atriale, implicato nell'ansia, nella depressione e nella risposta allo stress (Frieling *et al.*, 2008, 2007). Negli anoressici inoltre è stato visto un numero elevato di metilazioni rispetto ai controlli nei siti CpG nel gene per il recettore per l'ossitocina OXTR, e i livelli di metilazione erano associati in modo negativo al BMI (Kim *et al.*, 2014). Studi di genome-wide hanno rivelato che nelle donne anoressiche, comparate con soggetti sani, ci sia una condizione globale di ipometilazione del DNA (Frieling *et al.*, 2007; Tremolizzo *et al.*, 2014), mentre uno studio ha riportato una condizione di ipermetilazione globale del DNA (Booij *et al.*, 2015).

Un altro gene studiato è quello per la leptina soprattutto data la sua caratteristica di essere trasportata attraverso la barriera ematoencefalica mediante un trasportatore e di avere recettori in diverse aree cerebrali (Considine, 2005; Maffei *et al.*, 1995; Morton, 2007; Morton *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Sia la leptina che i suoi recettori sono possibili target di modificazioni epigenetica. Questo soprattutto durante lo sviluppo dove la leptina e i suoi recettori sono coinvolti nei processi di migrazione e sviluppo neuronali (Pan *et al.*, 2008). Nella regione promotrice del gene per la leptina si trova un'alta densità di metilazione delle citosine e questo sembra soggetto ad una regolazione epigenetica (Stöger, 2006).

Anche il gene per il BDNF risulta interessato a modificazioni epigenetiche e questa neurotrofina è molto importante ed è spesso associato con i disordini alimentari (Mercader *et al.*, 2007; Nakazato *et al.*, 2009). Il BDNF sembra regolare la deacetilasi

istonica di tipo 2 nel cervello e questo influenza la regolazione epigenetica di altri geni in particolar modo le modificazioni istoniche di geni associati al rischio di patologie alimentari (Nott *et al.*, 2008). Lo studio di Tremolizzo e collaboratori (Tremolizzo *et al.*, 2014) ha valutato eventuali metilazioni del DNA nel plasma di pazienti adolescenti affetti da AN e soggetti sani ed un eventuale correlazione con variazioni ormonali. È stata individuata una moderata diminuzione globale del DNA correlata con i livelli plasmatici di leptina ed ormoni steroidei.

1.6.1 *Effetto delle modificazioni epigenetiche a carico del sistema endocannabinoide nell'anoressia nervosa*

Il sistema endocannabinoide ha un importante ruolo nell'AN ed è per questo che negli ultimi anni si sono sempre più concentrate le ricerche su possibili modificazioni genetiche ed epigenetiche dei suoi principali componenti, che possono essere alla base dell'instaurarsi della patologia. Non solo, diversi studi si sono concentrati anche sull'ereditabilità di modificazioni geniche a carico di questo sistema trasmettitoriale che costituiscono un ulteriore fattore di rischio per l'incombenza della patologia. In studi su gemelli l'ereditabilità dell'AN si aggira intorno ad un range tra lo 0.48 ed lo 0.74, ciò significa che il 74% delle variazioni fenotipiche può essere spiegato da fattori genetici additivi (Bulik *et al.*, 2006; Kipman *et al.*, 1999; Klump *et al.*, 2001; Kortegeard *et al.*, 2001). Uno studio su pazienti anoressiche e bulimiche ha valutato i livelli di mRNA dei recettori CB1 e CB2 nel plasma. I risultati hanno mostrato un'elevata concentrazione dell'mRNA del recettore CB1 nelle pazienti anoressiche e bulimiche, rispetto ai soggetti sani. È stato valutato se quest'elevata presenza dell'mRNA relativo al recettore CB1 fosse imputabile ad un'alterazione epigenetica nella regione promotrice del gene. Non sono state trovate differenze significative nelle metilazioni del gene promotore che possano essere correlate con l'aumento dell'mRNA dei recettori CB1. Come in altri studi, è stata vista un'associazione tra l'espressione dell'mRNA dei recettori CB1 e la severità dei sintomi della patologia. L'ipotesi alla base della sovraregolazione dell'mRNA dei recettori CB1 sia un tentativo di compensare l'alterazione del tono endocannabinoide dovuta anche ad una ipotetica ridotta sensibilità del recettore CB1 (Frieling *et al.*, 2009). Viste le innumerevoli comorbidità psichiatriche e alterazioni comportamentali nei pazienti affetti da disturbi alimentari, uno studio ha valutato una

possibile correlazione tra il sistema endocannabinoide ed i comportamenti di autolesionismo in pazienti anoressici e bulimici confrontati con pazienti aventi lo stesso disturbo ma non con comportamenti di autolesionismo. È stata vista una riduzione nel plasma dei livelli di mRNA dei recettori CB1 di pazienti anoressici con comportamenti autolesionistici rispetto a quelli senza questi comportamenti. Questi risultati indicano ancora una volta il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella patologia e suggeriscono un loro possibile ruolo riguardo ai comportamenti compulsivi e autolesionistici (Schroeder *et al.*, 2012).

1.7 Gli acidi grassi e il loro ruolo nel comportamento alimentare

1.7.1 Gli acidi grassi

Gli acidi grassi svolgono un ruolo vitale per l'organismo in quanto fonte energetica, componente delle membrane cellulari e precursore di numerose molecole implicate in diverse vie del segnale cellulare (Calder, 2015). Gli acidi grassi possono essere sintetizzati dall'organismo o introdotti con la dieta; essi vengono utilizzati come fonte di approvvigionamento diretto per il consumo di energia oppure vengono conservati sotto forma di trigliceridi (TG) a costituire la maggiore fonte energetica dell'organismo.

Nell'alimentazione moderna sono presenti una grande quantità di cibi palatabili e ricchi in grassi preferiti proprio per la loro appetibilità e per la gratificazione che ne deriva (Drewnowski, 1997; Jager e Witkamp, 2014; Sørensen *et al.*, 2003; Weltens *et al.*, 2014).

Gli acidi grassi sono formati da una catena alifatica contenente un gruppo carbossilico ad una estremità. La catena alifatica è solitamente lineare, in alcuni casi di catena ramificata, la cui lunghezza determina specifiche caratteristiche chimico-fisiche ed è utilizzata per classificarli in due macro famiglie: gli acidi grassi a catena corta (con un numero di atomi di carbonio inferiore a 14) e quelli a catena medio e lunga (con un numero di atomi di carbonio superiore o uguale a 14). Nella catena carboniosa il numero di atomi di carbonio è generalmente pari e la catena può possedere uno o più doppi legami; questa caratteristica determina la temperatura di fusione degli acidi grassi. In base ai doppi legami presenti, gli acidi grassi si possono classificare in acidi

grassi saturi (SFA), se la catena alifatica non contiene doppi legami, e insaturi, quando nella catena sono presenti uno o più doppi legami. Gli acidi grassi insaturi possono ulteriormente suddividersi in monoinsaturi (MUFA) quando presentano un solo doppio legame, e polinsaturi (PUFA) quando sono presenti più doppi legami (superiore a 1). Alcuni tipi di acidi grassi insaturi sono detti essenziali e sono classificati in base a dove si posiziona l'ultimo doppio legame a partire dall'ultimo atomo di carbonio della catena alifatica in:

- PUFA n-6: tra i principali troviamo l'acido linoleico (LA, 18:2) e l'acido arachidonico (AA, 20:4)
- PUFA n-3: il principale acido grasso di cui fa parte è l'acido α -linolenico (ALA, 18:3), poi troviamo l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6);
- PUFA n-9: il principale acido grasso di questa famiglia è l'acido oleico (OA, 18:1).

I trigliceridi assunti con la dieta iniziano ad essere degradati nella bocca dalle lipasi linguali per continuare nel tratto digerente. Nel lumen intestinale, gli acidi grassi liberi sono incorporati all'interno di micelle e possono essere assorbiti dagli enterociti dove vengono demoliti per sintetizzare nuovi TG che poi insieme al colesterolo e alle lipoproteine compongono i chilomicroni (Dash *et al.*, 2015). I chilomicroni sono trasportati attraverso il sistema linfatico e rilasciati nel sangue. Nell'apparato circolatorio gli acidi grassi possono accedervi legati o incorporati in differenti strutture, come acidi grassi liberi, in TG ed esteri del colesterolo, in chilomicroni, in lipoproteine a bassa densità e sottoforma di eritrociti (Risé *et al.*, 2007). Questo per evitare la tossicità dovuta agli acidi grassi ma anche per facilitare il loro trasporto e la loro conservazione (Solinas *et al.*, 2015).

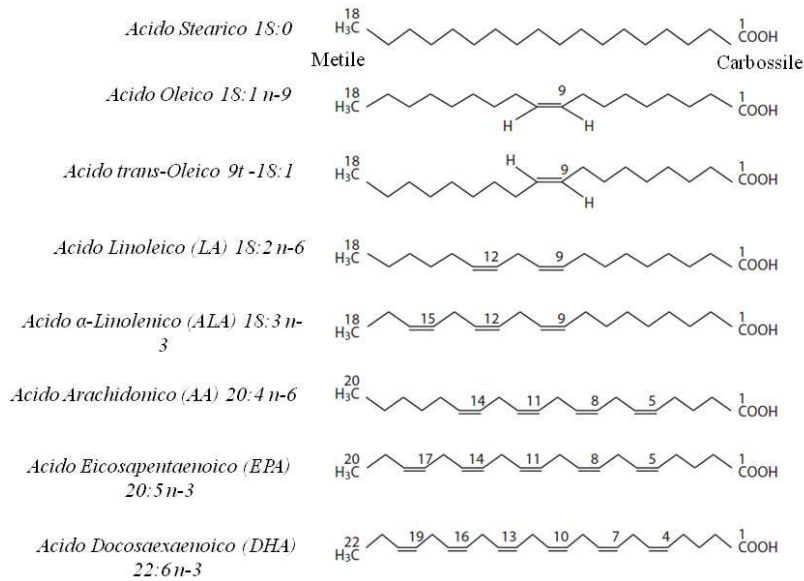


Figura 13. Struttura di alcuni fra i più comuni acidi grassi presenti nella dieta.

Ossidazione degli acidi grassi

Il grasso, conservato sottoforma di TG, è la fonte di energia maggiore all'interno dell'organismo. L'energia ottenuta dal catabolismo di 1 g di grasso è approssimativamente 9 kcal (37.7 kJ), comparata con le 4 kcal (16.8 kJ) ottenuta dalle proteine o dai carboidrati. Il catabolismo del grasso coinvolge l'ossidazione di glicerolo e di catene di acidi grassi, i due costituenti del grasso corporeo. La maggior parte delle cellule dell'organismo è in grado di convertire il glicerolo in gliceraldeide fosfato. Gli acidi grassi producono energia grazie alla β -ossidazione all'interno dei mitocondri. Durante questo processo le loro catene carboniose vengono rotte in frammenti di acido acetico e vengono prodotte molecole di Acetil-CoA che entrano nel ciclo di Krebs per produrre energia. Nonostante tutto, la β -ossidazione non è un processo molto efficiente poiché richiede il trasporto all'interno del mitocondrio attraverso una serie di reazioni che coinvolgono la carnitina come trasportatore e quindi un dispendio energetico importante. Questo potrebbe essere uno dei motivi per cui gli acidi grassi sono utilizzati in modo meno efficiente per la produzione di energia rispetto ai carboidrati, e vengono preferenzialmente immagazzinati nel tessuto adiposo. Inoltre, l'ossidazione degli acidi

grassi a lunga catena inizialmente ha luogo nei perossisomi e non è un meccanismo molto efficiente. La struttura degli acidi grassi influenza enormemente la quantità di ossidazione, in generale quelli a lunga catena vengono ossidati molto lentamente e quelli insaturi più velocemente dei SFA. Nei ratti, l'ossidazione degli SFA diminuisce con l'aumento della lunghezza della catena carboniosa (lauristico > miristato > palmitato > stearato) (Leyton *et al.*, 1987).

Sintesi de novo degli acidi grassi

Il processo di sintesi degli acidi grassi comporta la rottura dei carboidrati in eccesso e provenienti dalla dieta in unità di acetato e a seguito di condensazioni formazione di molecole di malonil CoA. In seguito le molecole di Acetil CoA si legano con una serie di molecole di malonil CoA per formare SFA o differenti catene carboniose e il prodotto finale è la formazione di acido palmitico (16:0).

Le reazioni di sintesi dell'acido grasso fino a questo stadio hanno luogo all'interno del complesso di sintesi degli acidi grassi. Una volta che l'acido palmitico viene rilasciato dal complesso sintetico, esso può essere elongato fino a formare l'acido stearico e altri SFA mediante l'aggiunta di ulteriori gruppi acetilici, attraverso l'azione degli enzimi di elongasi. Nei tessuti animali la desaturazione degli SFA sintetizzati *de novo* si ferma con la sintesi dei MUFA della serie n-9. Questa conversione è resa passibile grazie all'enzima $\Delta 9$ desaturasi, un enzima molto attivo nei mammiferi che introduce doppi legami in posizione 9-10 della catena degli acidi grassi. L'acido oleico (OA) ovvero 18:1 n-9, è il principale prodotto dell'enzima $\Delta 9$ desaturasi. I MUFA sono i principali substrati per le elongasi degli acidi grassi con produzione di acido vaccenico (18:1 n-7) dall'acido palmitoleico ed eicosenoico (20:1 n-9).

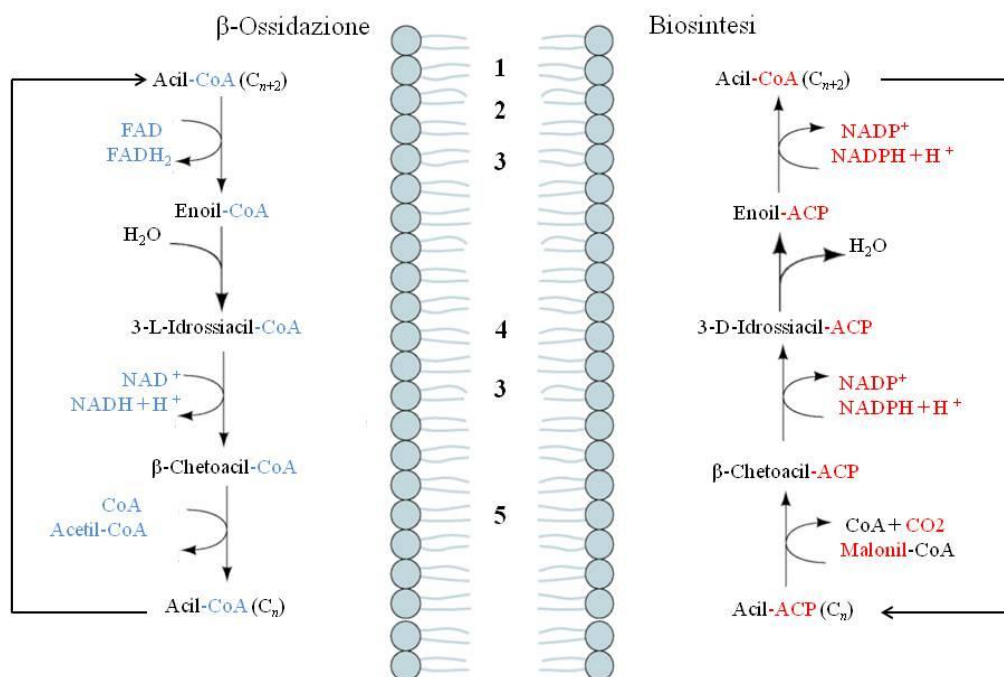


Figura 14. β -ossidazione e sintesi *de novo* degli acidi grassi. Le differenze fra le due vie riguardano 1. la localizzazione cellulare 2. il trasportatore di gruppi acilici 3. l'accettore/donatore di elettroni 4. la stereochimica delle reazioni di idratazione/deidratazione 5. il prodotto finale/iniziale.

Funzioni degli acidi grassi

Gli acidi grassi svolgono molteplici funzioni ma il loro ruolo più importante è quello di essere il componente fondamentale dei fosfolipidi delle membrane cellulari. Differenti cellule, membrane e fosfolipidi hanno una diversa composizione in acidi grassi e questa è altamente influenzata dal tipo di dieta, dal metabolismo e da altri fattori come anche quelli genetici. La composizione delle membrane cellulari influenza la loro fluidità, caratteristica peculiare delle membrane cellulari, che di conseguenza si riflette sulla funzionalità delle proteine di membrana e del movimento di queste all'interno delle membrane. I lipidi di membrana sono inoltre importanti precursori di molecole coinvolti nel segnale cellulare come il diacilglicerolo, le ceramidi e gli endocannabinoidi ed è noto come la composizione degli acidi grassi di queste molecole che riflette quella delle membrane lipidiche, influenza la loro attività all'interno della cellula. Gli acidi grassi saturi come il miristico (14:0) e il palmitico (16:0) hanno ruolo ben precisi nell'acilazione delle proteine di membrana e nell'ancorarle alla membrana plasmatica. L'acido arachidonico (20:4), che fa parte dei PUFA, è un importante

precursore degli eicosanoidi, delle prostaglandine, dei trombossani e dei leucotrieni. Non solo, molti acidi grassi sono in grado di regolare l'attività di fattori di trascrizione e questo fa sì che abbiano un ruolo importante anche nel controllo dell'espressione genica di svariate proteine e componenti cellulari. Viste tutte le funzioni che hanno gli acidi grassi è ormai nota la loro cruciale importanza nell'insorgenza di svariate patologie, nel controllo e nella regolazione del metabolismo (Calder, 2015).

Acidi grassi saturi

Gli acidi grassi saturi (SFA) non contengono doppi legami all'interno della catena carboniosa, la maggior parte degli SFA presenti in natura hanno una struttura non ramificata con un numero pari di atomi di carbonio. Gli SFA sono ulteriormente divisi in tre categorie a seconda della lunghezza della catena alifatica: a catena corta (3-7 atomi di carbonio), a catena media (8-13 atomi di carbonio), a catena lunga (14-20 atomi di carbonio) e a catena molto lunga (> 21 atomi di carbonio).

Gli SFA possono essere assunti mediante la dieta, diversi alimenti come l'olio di cocco e grassi di origine animale sono ricchi di questi acidi grassi. Gli olii vegetali così come gli olii derivati dal pesce e il pesce stesso sono ricchi di acidi grassi saturi in particolare l'acido palmitico ed insieme all'acido stearico e miristico sono quelli più comuni e diffusi. Gli SFA possono essere anche sintetizzati attraverso il metabolismo di carboidrati e aminoacidi. Molte membrane cellulari contengono porzioni significative di acido stearico e palmitico, le membrane fosfolipidiche neuronali contengono acidi grassi saturi a lunga catena. Le ceramidi e gli sfingolipidi sono ricchi di acidi grassi e i gangliosidi invece sono ricchi di acido stearico. Il fatto che queste componenti strutturali siano ricche in acidi grassi saturi è correlato alla loro posizione e funzione. Le zattere lipidiche, che sono dei micro domini strutturali della membrana con funzioni organizzative e di assemblaggio di molecole di segnalazione, influenzano la fluidità delle membrane regolando anche il traffico di neurotrasmettitori e recettori, contengono sfingolipidi e fosfolipidi ricchi di acidi grassi saturi (Simon e Cravatt, 2006). Gli SFA sono in grado di influenzare l'espressione genica attraverso la loro azione sui fattori di trascrizione. Diversi SFA sono in grado di aumentare l'mRNA di PGC-1 β , un coattivatore di una famiglia di fattori di trascrizione detti SREBP. Questi fattori di trascrizione regolano la sintesi e il metabolismo del colesterolo, degli acidi grassi, dei

triacilgliceroli, dei fosfolipidi e dei geni che codificano per i recettori LDL per le lipoproteine e diversi enzimi per la sintesi del colesterolo (Lin *et al.*, 2005). Nel fegato, gli SFA, son in grado di agire come coattivatori di particolari recettori promuovendo la secrezione epatica delle proteine VLDL (Xu *et al.*, 2013). L'acido laurico e palmitico sono in grado inoltre di indurre l'attivazione e la traslocazione di determinati fattori di trascrizione che vengono attivati in risposta a stimoli infiammatori (Lee *et al.*, 2001; Maloney *et al.*, 2009). Attraverso il ruolo regolatore di fattori di trascrizione coinvolti nel metabolismo lipidico e nell'infiammazione, gli SFA influenzano la biosintesi del colesterolo, degli acidi grassi, dei triacilgliceroli, l'assemblaggio e il rilascio delle lipoproteine e i processi infiammatori. Ci sono inoltre numerose evidenze che dimostrano l'importanza e le innumerevoli funzioni degli SFA come laurico, miristico e palmitico nell'aumentare la concentrazione totale e lipoproteine a bassa densità (LDL) del colesterolo (Mensink *et al.*, 2003), sull'influenza che hanno nell'aumentare la coagulazione del sangue (Baer *et al.*, 2004), l'infiammazione (Baer *et al.*, 2004) e l'insulino resistenza (Risérus, 2008).

Acidi grassi insaturi

I MUFA che maggiormente troviamo negli alimenti e che quindi l'uomo assume con la dieta sono l'acido oleico (18:1 n-9), l'acido palmitoleico (16:1 n-7) e l'acido vaccenico (18:1 n-7).

L'acido oleico si trova nei prodotti derivati animali come il lardo e il burro, ma anche nell'olio dove l'acido oleico rappresenta il 70% degli acidi grassi presenti. L'acido palmitoleico si trova in molti olii vegetali e in grassi animali. Sia l'acido palmitoleico che oleico possono essere sintetizzati nell'uomo a partire rispettivamente dall'acido palmitico e stearico mediante l'azione di una $\Delta 9$ -desaturasi. Diversi fosfolipidi di membrana contengono proporzionali quantità di acido oleico e palmitoleico. L'acido oleico è in grado di abbassare la pressione sanguigna ed ha un effetto sul controllo del glucosio e sulla sensibilità all'insulina (Bermudez *et al.*, 2011; Perez-Martinez *et al.*, 2011). Spesso viene utilizzato per rimpiazzare nelle diete acidi grassi saturi che risultano avere effetti deleteri se assunti in grandi quantità, ed è stato visto agire su fattori di trascrizione coinvolti nell'omeostasi lipidica come SREBP (van Deursen *et al.*, 2009). Anche l'acido palmitico agisce su questa famiglia di fattori di trascrizione ed è

coinvolto nei processi infiammatori (Guo *et al.*, 2012). L'introduzione nella dieta di acido palmitico è stato visto ridurre nell'uomo i livelli plasmatici di LDL e triacilgliceroli (Curb *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2003). È stata trovata inoltre un'associazione tra una migliore sensibilità all'insulina e acido palmitico libero circolante (Stefan *et al.*, 2010). Questi due principali MUFA hanno quindi ruoli importanti nel metabolismo e in diverse funzioni biologiche e sembrano avere un effetto benefico sulla salute. In particolare l'acido oleico contenuto nell'olio d'oliva è considerato benefico per le sue proprietà e per far parte della dieta mediterranea considerata sana e consigliata per ridurre il rischio di malattie cardiovascolari e metaboliche. L'acido palmitoleico è sempre di maggior interesse nell'ambito della ricerca e diversi studi si stanno concentrando sulle sue potenzialità e funzionalità nella salute umana.

L'acido linoleico, LA, è un acido grasso essenziale che pertanto può essere assunto con la dieta e non prodotto dall'organismo. Diversi olii vegetali e semi contengono questo acido grasso che è quindi di origine vegetale. Anche l'acido arachidonico (AA), che deriva dall'LA è considerato essenziale perchè la sua sintesi dipende dalla presenza del suo precursore. L'AA può trovarsi anche nella carne, nelle interiora animali e nelle uova. Le membrane lipidiche contengono sia LA che AA in determinate proporzioni, l'AA può contribuire quasi fino al 20% degli acidi grassi presenti nella membrana.

LA è un importante costituente delle ceramidi trovate nella pelle, particolarmente importanti per il rinnovo cellulare e come costituenti delle membrane. LA è in grado anch'esso di tenere bassi i livelli di colesterolo e LDL nel sangue agendo attraverso i fattori di trascrizione SREBP per ridurre la biosintesi di colesterolo (Mensink *et al.*, 2003). Ha la capacità di tenere bassa la pressione sanguigna anche se ci son studi che sostengono il contrario (Czernichow *et al.*, 2010), inoltre incrementa la sensibilità all'insulina (Risérus, 2008).

L'AA ha un ruolo molto importante nel cervello ed è coinvolto nelle vie del segnale essendo il precursore degli endocannabinoidi. Non solo, l'AA è precursore degli eicosanoidi che comprendono le prostaglandine, i trombossani e i leucotrieni. I metaboliti dell'AA sono implicati nell'infiammazione, nel dolore, nella regolazione della risposta immunitaria, nella contrazione muscolare, nelle funzioni renali, nella

proliferazione di cellule tumorali e nello sviluppo dei tumori (Turcotte *et al.*, 2015; Vachier *et al.*, 2002).

L'acido grasso essenziale appartenente alla famiglia degli n-3, l'acido α -linolenico (18:3 n3) è sintetizzato nelle piante, lo troviamo nei semi, nelle noci e negli olii vegetali. L'acido α -linolenico viene convertito in acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e in acido decosapentaenoico (DPA, 22:5 n3) e in acido docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3). Questa via biosintetica utilizza gli stessi enzimi del metabolismo dell'acido linoleico e questo significa che esiste una competizione diretta per il metabolismo degli acidi grassi PUFA n-6 e n-3. Nella dieta occidentale il rapporto fra acido linoleico e α -linolenico è di 7 a 20. La ragione per la quale il metabolismo dell'acido α -linoleico a EPA è basso nell'uomo e quello del DHA è molto limitato è che EPA, DPA e DHA si trovano nei frutti di mare, soprattutto nel pesce azzurro e negli integratori a base di olio di pesce. Almeno ché non si assuma una dieta con regolare consumo di pesce azzurro o integratori a base di olii di pesce, l'acido α -linolenico sarà tra gli acidi grassi PUFA ω -3 quello più comune nella dieta. Le membrane cellulari contengono una piccola quantità di acido α -linolenico ma diverse membrane contengono maggiori quantità di EPA e ancor di più di DPA e DHA. Un'eccezione è costituita dalle membrane neuronali e oculari, che contengono alte concentrazioni di DHA (Crawford *et al.*, 1976; Makrides *et al.*, 1994; Skinner *et al.*, 1993). Spesso, i PUFA ω -3 suppliscono all'AA, in tal modo diminuiscono la quantità di substrato per la sintesi di eicosanoidi.

La tipica struttura dei PUFA ω -3, in particolare del DHA, fa presupporre un importante influenza sulle proprietà fisiche delle membrane in cui si trovano incorporati, agendo sulle proteine di membrana e sulla formazione delle zattere lipidiche. EPA e DHA modulano l'attivazione di fattori di trascrizione e di conseguenza agiscono sull'espressione genica (Calder, 2012). I fattori di trascrizione che vengono influenzati da questi acidi grassi sono NF-kB, PPAR α e γ , ed infine SREBP (Deckelbaum *et al.*, 2006; Jump, 2002; Krey *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 2003). La loro azione sulla regolazione dei fattori di trascrizione li rende centrali nel controllo dell'infiammazione, del metabolismo degli acidi grassi e del triacilglicerolo e nella differenziazione degli adipociti (Calder, 2015, 2014, 2012). La sostituzione da parte di

EPA e DHA dell'AA fa sì che possano influenzare l'infiammazione, la risposta immunitaria, la vasocostrizione e altri processi.

Un adeguato apporto di ω -3 PUFA come il DHA sembra essere essenziale per un ottimale sviluppo della vista, dei neuroni e comportamentale infantile. È stato visto che un'alimentazione durante l'infanzia che include DHA o AA, migliora le funzioni visive e cognitive (Calder, 2014). Ma non solo, effetti benefici di EPA e DHA sono stati visti durante l'infanzia sull'attenzione, l'apprendimento, disordini comportamentali, depressione, disordini psichiatrici come la sindrome bipolare maniacale, l'aggressione e la schizofrenia (Bélanger *et al.*, 2009; Milte *et al.*, 2012; Peet *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2012; Richardson e Puri, 2002; Stevens *et al.*, 2003; Stoll *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2003, p.; Yui *et al.*, 2012). I PUFA ω -3 agiscono sulla concentrazione nel sangue dei lipidi in particolare EPA e DHA limitando le concentrazioni sanguigne di trigliceridi (Shearer *et al.*, 2012) e agiscono sul controllo della pressione sanguigna interessando i processi di produzione degli eicosanoidi con effetti coagulanti, di secrezione dell'aldosterone e la produzione di acido nitrico e agiscono nell'abbassare la pressione sanguigna (Appel *et al.*, 1993; Balk *et al.*, 2004). EPA e DHA sono coinvolti in processi cronici infiammatori come l'artrite reumatoide, nel ridurre il rischio di insorgenza di patologie allergologiche nell'infanzia e hanno un ruolo di difesa contro le infezioni (Miles e Calder, 2014).

1.7.2 *Ruolo degli acidi grassi nell'anoressia nervosa*

Le persone affette da AN come già descritto, limitano la quantità di cibo che consumano. È stata dimostrata l'importanza degli acidi grassi PUFA nel recupero del peso corporeo in pazienti anoressici, sottolineando l'importanza e gli effetti benefici dell'acido linoleico e α -linolenico (Burr e Burr, 1929). Non solo, gli effetti positivi del trattamento con PUFA sono stati riscontrati in altri pazienti anoressici ma anche pazienti affetti da schizofrenia, disturbo bipolare e depressione (Perica e Delas, 2011), mostrando benefici anche per il decadimento cognitivo nella AD (Thomas *et al.*, 2015). Non sono ancora note le cause alla base dell'effetto benefico dei PUFA nelle malattie sopraelencate ma sicuramente il ruolo che i PUFA hanno sulle funzioni cerebrali, sulla regolazione della risposta infiammatoria sono fattori chiave nel miglioramento dei sintomi delle malattie mentali e dei disordini neurodegenerativi (Yehuda *et al.*, 2005).

Tutte le componenti individuali dei PUFA sono importanti e il loro ruolo è stato ben studiato, ma ancora di più è considerata determinante in diverse patologie il rapporto tra la concentrazione di PUFA ω 3 e ω 6 (Nishizaki *et al.*, 2014; Simopoulos, 2016).

Per quanto riguarda i benefici dei PUFA nel migliorare i sintomi dell'AN ci sono diverse evidenze scientifiche che dimostrino questo effetto, mentre non è ancora chiaro il ruolo dei PUFA nell'insorgenza della patologia e come essi abbiano effetti positivi sui sintomi. È stato dimostrato che i pazienti anoressici mostrano una differenza nel profilo PUFA rispetto ai controlli e gli eicosanoidi derivati dai PUFA sono associati al rischio della patologia e nello svilupparsi delle comorbidità psichiatriche (Shih, 2017; Shih e Woodside, 2016). Questi studi mettono in correlazione la possibilità che il metabolismo dei PUFA porti ad un aumento dei mediatori lipidici pro-infiammatori e che questo possa essere un meccanismo chiave che sottende all'avversione verso il cibo nell'AN. Questa ipotesi è stata supportata dal fatto che i pazienti anoressici grasso-fobici che riportano una sintomatologia gastrointestinale più severa rispetto ai pazienti anoressici non grasso-fobici (Lee *et al.*, 2012; Yang e Shih, 2018). L'AN è caratterizzata altresì da una riduzione se non assenza, del consumo di cibi considerati grassi (Steinglass *et al.*, 2015). Le forti limitazioni nel consumo di cibo di diverso tipo compresi quelli considerati grassi, sono cruciali per il rischio di ricaduta negli anoressici (Schebendach *et al.*, 2011).

Il primo studio che ha dimostrato un'alterazione dei PUFA nei pazienti affetti da AN risale al 1985 (Langan e Farrell, 1985), dove son stati esaminati i livelli di acidi grassi totali e nella frazione fosfolipidica nel plasma. I risultati hanno dimostrato una diminuzione dei livelli di LA e livelli elevati di DHA rispetto ai controlli. Inoltre sono stati trovati diminuiti i livelli totali di PUFA ω -6. Un altro studio ha esaminato, nel plasma di pazienti anoressici, la composizione dei fosfolipidi in termini di acidi grassi, i trigliceridi e gli esteri del colesterolo. A livello dei fosfolipidi non sono state trovate anomalie nei livelli di LA e ALA, ma elevati livelli di acido γ -linolenico (GLA, 18:3 n6) e diminuiti livelli di acidi grassi PUFA della serie ω -6 e ω -3 a lunga catena. Negli esteri del colesterolo i livelli di PUFA erano notevolmente diminuiti così come nei triacilgliceroli, ed in entrambi vi era una significativa diminuzione di LA, GLA, ALA e acido diomo-gamma-linolenico (DGLA, 20:3 n6) (Holman *et al.*, 1995a). Ancora, in un altro studio su pazienti anoressici e controlli sani, sono stati trovati ridotti livelli di

PUFA in tutte le classi di acidi grassi plasmatici, ma nessuna differenza nei PUFA della serie n-3. I livelli di LA sono anche in questo caso notevolmente diminuiti negli esteri del colesterolo, nei triacigliceroli e nelle fosfatidilicoline. Il DHA era ridotto solo negli esteri del colesterolo (Zák *et al.*, 2005). Sono stati misurati inoltre anche i PUFA presenti nelle membrane eritrocitarie in ragazze anoressiche e controlli sani. Sono stati valutati sia al momento del ricovero e dopo un anno. Alla momento del primo ricovero il 67% delle pazienti mostrava ridotti livelli di LA ed elevati livelli di acido docosapentaico (DPA; 22:5 n6) e ridotti livelli di PUFA ω -6. Negli eritrociti sono stati trovati ridotti livelli di AA nessuna differenza nei PUFA ω -3 (Swenne *et al.*, 2011; Swenne e Rosling, 2012). Inoltre, quando nei pazienti in cui si sviluppa, in associazione al disturbo alimentare, anche un disordine depressivo sono stati trovati ridotti livelli di EPA, DHA e DPA, diminuiti livelli di PUFA n-3 e un elevato rapporto tra PUFA n-6/n-3 e AA/DHA (Swenne *et al.*, 2011). Il recupero di un'alimentazione normale e del peso corporeo porta ad una normalizzazione dei livelli di PUFA alterati (Swenne *et al.*, 2011).

In 22 pazienti anoressici e nei rispettivi soggetti sani sono stati misurati i livelli di PUFA nei fosfolipidi di membrana dei globuli rossi. I pazienti AN mostrano ridotti livelli di PUFA totali a lunga catena e di DHA, elevati livelli di ALA. Il rapporto tra AA/EPA è risultato elevato e la concentrazione totale di PUFA n-3 era ridotta rispetto ai controlli. Gli autori hanno riscontrato inoltre una diversa correlazione tra i livelli di ALA e la massa grassa ed hanno interpretato questo risultato sostenendo come una dieta ricca in ALA sia associata ad un bilancio energetico negativo. (Caspar-Bauguil *et al.*, 2012). Un ulteriore studio è stato condotto in pazienti AN, in pazienti riabilitati dalla patologia e in soggetti sani e sono stati valutati, nel plasma, i rapporti fra la concentrazione di LA:ALA e di AA:EPA ed è stato visto che questi sono diminuiti nei soggetti malati rispetto a quelli in recupero e ai soggetti sani (Shih *et al.*, 2016). Alla luce di tutte queste evidenze si può notare come l'aumentato livello di PUFA n-3 sia dovuto ad una totale eliminazione dei cibi ricchi di PUFA n-6 dalla dieta consumata dai pazienti AN cronici, che comprende anche l'eliminazione di prodotti di derivazione animale (Drewnowski *et al.*, 1988). Ma le anomalie nel rapporto fra AA/DGLA o DGLA/LA suggeriscono come ci siano delle cause non strettamente correlate al tipo di dieta, come la differenza genetica nel metabolismo dei PUFA possa essere una

conseguenza di uno stato di malnutrizione cronica o dovuta ad un'alterazione dei principali ormoni regolatori (Brenner, 2003; Warensjö *et al.*, 2009).

1.7.3 *Acidi grassi e sistema endocannabinoide: ruolo nella regolazione del comportamento alimentare*

Una dieta ricca in grassi è in grado di modulare i livelli di endocannabinoidi per quanto riguarda la loro composizione in acidi grassi (Diep *et al.*, 2010; DiPatrizio *et al.*, 2011; Marzo *et al.*, 2008). Negli animali, una dieta ricca in grassi porta all'insorgenza di un comportamento di binge eating con aumento dei livelli di AEA e 2AG (Higuchi *et al.*, 2012; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Piscitelli *et al.*, 2011).

Gli studi sugli effetti degli SFA sugli endocannabinoidi sono limitati e si concentrano maggiormente sull'acido palmitico e stearico. È stato visto una diminuzione dell'assunzione di cibo dopo la somministrazione di etanolamide sterolica in topi sottoposti a restrizione calorica (Terrazzino *et al.*, 2004). I livelli di PEA sono ridotti nel cervello, nel fegato e nell'intestino di ratti dopo la somministrazione orale di EPA e DHA (Artmann *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda gli acidi grassi appartenenti alla famiglia MUFA, l'acido oleico è quello più studiato in relazione alla sintesi degli endocannabinoidi. L'acido oleico è il precursore per la sintesi di OEA e la sua sintesi dipende dal trasportatore di membrana. La somministrazione di OEA riduce i livelli di grelina e di NPY e di conseguenza limita l'assunzione di cibo nei topi in restrizione calorica (Gaetani *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Soria-Gómez *et al.*, 2010). Ancora, la sua somministrazione orale congiunta ad una dieta ricca in grassi, nei topi, provoca un aumento della FAAH e dell'espressione genica dell'adiponectina, con conseguente riduzione dell'assunzione di cibo e della massa adiposa (Petersen *et al.*, 2006; Thabuis *et al.*, 2010). La somministrazione orale di OEA riduce il contenuto lipidico negli epatociti, i livelli plasmatici di trigliceridi e del colesterolo, lo svuotamento gastrico e la motilità intestinale (Aviello *et al.*, 2008). L'OEA è in grado di indurre il senso di sazietà grazie alla sua azione sui PPAR α regolandone l'espressione genica non solo di questi recettori ma anche dell'enzima traslocasi per gli acidi grassi, la proteina di tipo 1 che trasporta gli acidi grassi e la proteina legante gli acidi grassi nel fegato (Fu *et al.*, 2005).

L'OEA è in grado di aumentare il rilascio di acidi grassi dagli adipociti in modo dose-dipendente e l'uptake di acidi grassi e la loro ossidazione da parte del muscolo scheletrico senza intaccare l'utilizzo del glucosio (Guzmán *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007). L'OEA è anche in grado di ridurre l'uptake di glucosio agendo sull'azione dell'AEA e del 2AG nel tessuto adiposo (González-Yanes *et al.*, 2005).

Il ruolo di EPA e DHA nella modulazione della sintesi degli endocannabinoidi riguarda la loro capacità di rimpiazzare l'AA nelle membrane lipidiche e di ridurre la sua sintesi (Hutchins *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2010) e come conseguenza si ha l'aumento della sintesi di eicosapentaenoil etanolamide (EPEA) e docosaesaenoil etanolamide (DHEA). EPA e DHEA non agiscono direttamente sull'appetito ma hanno un ruolo antinfiammatorio (Balvers *et al.*, 2010). In colture di adipociti di topo il trattamento con EPA/DHA in combinazione con differenti acidi grassi liberi, il DHA era in grado di bloccare la conversione dell'AA in AEA (Matias *et al.*, 2008). In studi preclinici e clinici è stato visto che EPA/DHA diminuiscono il 2AG e l'AEA in soggetti obesi con una riduzione del rapporto n-3/n-6, un aumento di NAPE-PLD, FAA e dell'espressione dell'mRNA codificante per i recettori CB2 (Balvers *et al.*, 2010; Banni *et al.*, 2011; Batetta *et al.*, 2009; Hutchins *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2010). L'integrazione di DHA/EPA sia negli animali che nell'uomo è in grado di diminuire i livelli cerebrali di 2AG, la massa corporea e prevenire lo sviluppo dell'obesità e questo effetto è in parte dovuta alla riduzione nella produzione di AEA e 2AG, ad una mancata stimolazione recetoriale e ad una conseguente diminuzione dell'appetito e dell'assunzione di cibo (Di Marzo *et al.*, 2010; Ruzickova *et al.*, 2004; Thorsdottir *et al.*, 2007).

LA è un importante modulatore del sistema endocannabinoide perché viene convertito in AA. Come già descritto una dieta ricca di LA spesso porta nell'uomo ad obesità, aumento della glicemia e insulino resistenza (Madigan *et al.*, 2000; Massiera *et al.*, 2010, 2003). Inoltre una dieta poco bilanciata con un alto contenuto in lipidi (maggiore del 60%) porta ad un aumento dell'AA nel fegato e nei globuli rossi che si traduce poi in un aumento di 2AG ed AEA, un aumento dell'assunzione di cibo, di leptina nel sangue e una possibile attivazione dei recettori cannabinoidegici (Alvheim *et al.*, 2012). La somministrazione nei topi di una dieta ricca in MUFA e PUFA per 14 settimane dimostra che in particolare a causa dell'elevata concentrazione di LA, si

aveva un aumento della FAAH nel tessuto muscolare e un aumento dell'obesità e dell'iperglicemia indicando una sovrattivazione del sistema endocannabinoide (Matias *et al.*, 2008).

1.8 Modelli animali di anoressia

Riprodurre l'AN mediante un modello animale risulta difficile a causa della complessa eziologia della malattia che vede coinvolti fattori sociali, culturali ma anche genetici ed ambientali. Il modello animale ha come caratteristiche principali la predominanza nel sesso femminile, l'insorgenza in età adolescenziale o nella pubertà, la diminuzione eccessiva del consumo di cibo con la conseguente drammatica perdita di peso, intensa attività fisica e infine alterazione ormonali tipiche dell'AN. I modelli animali costituiscono un importante punto di partenza per lo studio della patologia in quanto consentono di capire le basi neurobiologiche e lo sviluppo dell'AN nonché lo studio di approcci terapeutici volti a migliorare, eventualmente nell'uomo, le condizioni dei pazienti affetti da questa patologia psichiatrica.

Uno dei modelli più utilizzati è quello ideato da Routtenberg e Kuznesof nel 1967 (Routtenberg e Kuznesof, 1967), chiamato "activity-based anorexia" (ABA) utilizzato sia in ratti che in topi. Questo modello riproduce aspetti fondamentali dell'AN: la restrizione alimentare, la perdita di peso, l'iperattività e le conseguenze fisiologiche e ormonali che conseguono alla drastica mancanza di nutrimento (Ploog e Pirke, 1987). Gli animali, ratti o topi, vengono sottoposti a restrizione alimentare ed hanno libero accesso ad una ruota che consente loro di correre. Queste due condizioni, in combinazione, conducono ad un declino del peso corporeo e ad un aumento dell'iperattività. Il protrarsi di questi due parametri porta ad una serie di conseguenze fisiopatologiche come l'amenorrea e infine alla morte. L'intensità dell'attività fisica aumenta in modo sconsiderato quando si aggiunge la restrizione alimentare che solitamente prevede l'accesso al cibo per un periodo di tempo limitato nell'arco della giornata (Kanarek e Collier, 1983). Gli animali mostrano alterazioni degli ormoni implicati nella regolazione del comportamento alimentare come bassi livelli di leptina e alti livelli di grelina plasmatici (van Elburg *et al.*, 2007) e bassi livelli di glucosio che aumentano l'attività sulla ruota (Takeda *et al.*, 2003).

I modelli che prevedono la sola restrizione alimentare presumono una riduzione del consumo calorico basandosi su differenti percentuali di cibo facendo riferimento alla quantità giornaliera di cibo consumato dal gruppo degli animali di controllo. Una riduzione del 30 % del consumo di cibo porta ad una perdita del 20 % del peso entro una settimana dall'inizio del protocollo (Bruss *et al.*, 2010). La restrizione alimentare può essere più severa raggiungendo il 50% rispetto al consumo di cibo dei controlli e comporta un aumento dei comportamenti ansiosi ma anche alterazioni a livello del SNC (Jahng *et al.*, 2007; Zgheib *et al.*, 2014). Alcuni modelli animali si basano su diete a basso o prive di contenuti in grassi. In particolare, queste ultime quando utilizzate, portano ad una perdita di peso fino all'80% rispetto ai controlli causando disfunzioni riproduttive sia nei maschi che nelle femmine (Burr e Burr, 1981; Marco *et al.*, 2011). Diete con un basso contenuto in carboidrati non hanno un alto impatto sul peso corporeo nè causano un aumento rispetto agli animali di controllo con una normale dieta e comportano disordini metabolici importanti (Borghjid e Feinman, 2012; Méquinion *et al.*, 2013) anche se non nei modelli di AN ampiamente utilizzati. I pazienti anoressici mostrano dei deficit plasmatici di aminoacidi essenziali (EAA) pertanto sono state utilizzate negli animali, delle diete carenti di questi amminoacidi. In particolare una dieta priva di valina conduce ad una grave perdita di peso corporeo rispetto alla mancanza di altri amminoacidi essenziali. Una dieta cronica priva di triptofano somministrata a roditori causa una progressiva perdita di peso, ma a lungo andare gli animali mettono in atto una serie di comportamenti che li consentono di evitare il consumo di questo cibo privo di amminoacidi essenziali (Ardis *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2012; Feurté *et al.*, 2000).

Lo stress e l'ansia sono fattori spesso associati all'insorgenza dell'AN e sempre più spesso vengono utilizzati modelli animali basati su questo aspetto. I più conosciuti comprendono il "restraint stress", l'esposizione al freddo ed il "chronic mild stress" (CMS). Per quanto riguarda il primo, il restraint stress, l'animale viene perlopiù delle volte immobilizzato in un cilindro di plastica oppure vengono immobilizzate le 4 zampe. Il periodo di immobilizzazione varia dai 30 minuti alle 6 ore e può avere effetti marcati sulla perdita di peso a seconda della durata del test. A seguito di questo stress l'animale è libero di mangiare ma spesso avviene una restrizione volontaria di cibo che si mantiene anche dopo il periodo di immobilizzazione (Chiba *et al.*, 2012; Shimizu *et*

al., 1989). Le variazioni ormonali a seguito di questo stress, spesso ripetuto, sono molto evidenti e riguardano gli ormoni come ACTH e CTS, ma anche grelina e leptina che rispettivamente aumentano e diminuiscono (Harris *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2013).

L'uso di basse temperature come evento stressogeno si basa su diverse ipotesi che vedono come origine dell'iperattività nell'AN un comportamento termo-regolatorio messo in atto per ristabilire la temperatura corporea (Carrera *et al.*, 2012; Emilio *et al.*, 2008). Un'esposizione a temperature che vanno dai -15°C sino ai 4 °C possono condurre ad una perdita di peso ma non necessariamente ad una riduzione dell'assunzione di cibo. Le variazioni ormonali sono le stesse sia se l'esposizione è breve (ore) sia lunga (8 giorni): un aumento dei livelli di CTS e di adrenalina plasmatici, la riduzione di leptina e di insulina (Brito *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2012; Gasparetti *et al.*, 2004; Manfredi *et al.*, 2013).

Il CMS è un tipo di modello che espone gli animali, ratti e topi, ad un tipo di stress variabile e cronico che dura dalle 3 alle 9 settimane e induce uno stato di anedonia e depressione nell'animale. Questo stato depressivo viene appurato anche con il test del saccarosio, il cui consumo risulta ridotto. La depressione è un aspetto molto comune negli anoressici e questo modello è in grado di indurre una perdita di peso corporeo e delle variazioni ormonali, come diminuzione di leptina e insulina che si riscontrano anche nell'uomo. Questo modello è molto utile per mimare un'alterazione dell'asse dello stress ed un mancato interesse verso cibi palatabili che si riscontrano spesso nella patologia. Tuttavia la complessità delle procedure unitamente alla velocità di recupero del peso corporeo limitano l'uso di questo modello per lo studio dell'AN.

Sono stati sviluppati dei modelli genetici come quello dei topi anoressici (anx/anx) caratterizzati da una mutazione genica di tipo recessivo che porta a una diminuzione dell'assunzione di cibo e a morte entro 20-30 giorni dalla nascita nei casi di omozigosi (Johansen *et al.*, 2003). Questi animali hanno ridotti livelli di leptina ma anche alterati livelli di CART e POMC, inoltre presentano tremori, atassia e iperattività. Un altro modello genetico prevede l'uso di topi che non esprimono il recettore mu oppioidergico (MOR). Questi topi presentano poco interesse nei confronti del cibo ma nessun tipo di deficit cognitivo, risultando un valido approccio per studiare i cambiamenti nel comportamento alimentare tipici dell'AN (Papaleo *et al.*, 2007)

1.9 Obiettivi dello studio

Sono sempre più le evidenze sperimentali che mettono in correlazione l'AN con alterazioni riguardanti diversi sistemi neurobiologici e con modificazioni a carico di componenti endocrine e organiche. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato, confermando diversi dati pre-clinici e clinici già presenti in letteratura, l'implicazione del sistema endocannabinoide nella fisiopatologia dell'AN (Di Marzo, 2009; Scherma *et al.*, 2017). Pertanto, l'obiettivo generale di questo lavoro è stato quello di investigare i possibili effetti a carico del sistema endocannabinoide e dopaminergico in ratti esposti ad un modello animale di AN e valutare possibili modificazioni nell'assetto lipidico periferico degli animali presi in esame. Per condurre i successivi esperimenti è stato utilizzato il modello ABA, talvolta parzialmente modificato rispetto al modello classico, presente in letteratura, per poter adattare la sperimentazione agli obiettivi che si intendeva perseguire.

Obiettivo 1

Il primo obiettivo della mia tesi (*esperimento 1*), è stato quello di investigare possibili variazioni nella regolazione della trascrizione genica dei componenti del sistema endocannabinoide e valutare eventuali modificazioni epigenetiche analizzando lo stato di metilazione dei geni presi in esame. Per fare questo, abbiamo utilizzato un modello animale di AN ampiamente validato, il modello “*activity-based anorexia*” (ABA), che riproduce nell'animale un fenotipo simil-anoressico e mima due aspetti fondamentali della patologia: la restrizione alimentare e l'intensa attività fisica (Routtenberg e Kuznesof, 1967). Esso consiste in una prima fase, detta di *induzione*, nella quale ratte femmine adolescenti del ceppo Sprague Dawley, vengono sottoposte a un protocollo di restrizione alimentare ed hanno libero accesso ad una ruota rotante. Grazie alla combinazione di questi due fattori gli animali anoressici ABA mostrano una drammatica perdita di peso corporeo ed un'intensa iperattività fisica se confrontati agli animali di *Controllo*. Le analisi di regolazione genetica sono state effettuate ad uno stadio *precoce* e *tardivo* dell'*induzione* del modello, per valutare se eventuali modificazioni epigenetiche potessero essere tempo-dipendenti. Inoltre, per valutare il possibile effetto della sola restrizione calorica, abbiamo effettuato le analisi su un

ulteriore gruppo sperimentale, i *Ristretti*, ai quali non è permesso di utilizzare la ruota per condurre attività fisica.

Obiettivo 2

Il secondo obiettivo di questo lavoro (*esperimento 2*), è stato quello di valutare possibili alterazioni a carico del sistema dopaminergico sempre in ratte sottoposte al modello ABA. Studi pre-clinici e clinici hanno individuato alterazioni di alcuni componenti di questo importante sistema neurotrasmettitoriale ed hanno dimostrato l'efficacia della sua modulazione farmacologica nel portare ad un miglioramento della sintomatologia anoressica in ratti esposti al modello animale ABA (DeGuzman *et al.*, 2017; Hebebrand *et al.*, 2003c; Legrand *et al.*, 2016).

Pertanto, in questa fase sperimentale abbiamo valutato i livelli centrali della monoamina DA e dei suoi metaboliti DOPAC e HVA, nonché la densità dei recettori D2. Le analisi hanno interessato diverse aree cerebrali (PFC, CPu, NAcc e Hyp) coinvolte nella regolazione omeostatica ed edonica del comportamento alimentare. Gli stessi parametri sperimentali sono stati analizzati non solo al termine della *induzione* ma anche dopo un periodo di ristorazione, detto di *recovery*, per valutare se eventuali modificazioni presenti durante l'*induzione* potessero essere ancora presenti o revertite dopo il recupero del peso corporeo.

Obiettivo 3

Diversi studi riguardanti l'assetto lipidico di pazienti anoressiche hanno mostrato importanti variazioni nei livelli plasmatici degli acidi grassi, mettendo in evidenza il ruolo che queste modificazioni talvolta rivestono nelle principali comorbidità tipiche dell'AN (Holman *et al.*, 1995). Spesso queste analisi sono condotte su pazienti che si trovano ad uno stadio cronico della malattia, talvolta preceduto da frequenti ricadute e caratterizzato da periodi di ospedalizzazione. Questo aspetto è molto importante nella patologia che presenta un alto tasso di recidiva e di cronicità che talvolta influenzano in maniera preponderante l'efficacia delle terapie (Eckert *et al.*, 1995; Pike, 1998; Strober *et al.*, 1997).

Pertanto, il terzo obiettivo della mia tesi (*esperimento 3*), è stato quello di valutare i livelli plasmatici di alcuni tra i più importanti acidi grassi in un protocollo

cronico del modello ABA. Per fare questo abbiamo esposto le ratte *ABA* ad una prima fase acuta costituita da tre fasi di *induzione* (6 giorni ciascuna) che si susseguono alternate da tre fasi di *recovery* (10 giorni ciascuna) dove le ratte recuperano il peso corporeo. Una volta terminata la fase acuta, le ratte *ABA* vengono sottoposte ad una fase detta cronica che prevede due *induzioni* croniche alternate da due fasi di *recovery* (10 giorni ciascuna). Gli animali possono accedere alle fasi di *recovery* successive alle fasi di *induzione* solo quando presentano una dimostrata perdita di peso del 20-25 % del loro peso basale. Pertanto, la durata delle *induzioni*, non è stata di sei giorni come le fasi di *induzione* acute precedenti, ma si sono protratte finché gli animali *ABA* perdessero la quantità di peso richiesta. Una volta raggiunto il peso, le ratte *ABA* avevano così accesso alla fase di *recovery*. Al termine della seconda *induzione* cronica e della seconda *recovery*, sia nei ratti *ABA* che nei rispettivi *Controlli*, sono stati valutati i livelli plasmatici di alcuni tra i più importanti acidi grassi.

2 Capitolo 2. Materiali e Metodi

2.1 Animali

Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti femmina del ceppo Sprague-Dawley (Envigo, Italia) del peso di 120-150 grammi (50 giorni dalla nascita). Le ratte sono state stabulate in numero di 4 per gabbia in una stanza con temperatura (21 ± 2 °C) e umidità (60 %) costanti e con un acqua e cibo standard forniti *ad libitum* (cibo: A04, Safe, France, 3 % kcal grassi, 61 % kcal carboidrati, 16 % kcal proteine, 20 % umidità, contenenti 2.9 kcal·g⁻¹). Il ciclo artificiale luce/buio di 12 ore (fase di luce con inizio dalle 12.00 e fine alle 00.00). Prima dell'inizio della fase di sperimentazione, gli animali sono stati giornalmente manipolati affinché potessero familiarizzare con l'operatore. Tutte le procedure e gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione sugli Animali dell'Università di Cagliari e dal Ministero della Salute, e condotti nel rispetto delle normative vigenti in Italia, previste dal D.L. 26/2014 che attua la direttiva europea 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

2.2 Apparato

Le gabbie sperimentali utilizzate erano di polycarbonato [48 (h) x 32 (l) x 47 (p) cm] vuote oppure dotate di una ruota rotante in acciaio (35 cm di diametro e 11 cm di altezza). Ciascuna gabbia con ruota era collegata ad un contatore magnetico digitale che monitorava le rotazioni complete della ruota (un intero giro della ruota equivale a 1.1 metri) (Ugo Basile, Italia).



Figura 15. Gabbia dotata di ruota e contatore magnetico.

2.3 Esperimento 1: studi di espressione genica e di regolazione epigenetica

Come mostrato nella figura 16, il protocollo ABA indotto nelle ratte consisteva in 3 fasi successive: *acclimatamento* (7 giorni), *adattamento* (7 giorni), *induzione* (3 giorni fase precoce, 6 giorni fase tardiva).



Figura 16. Rappresentazione schematica del protocollo ABA usato per gli studi biomolecolari.

Durante la fase di *acclimatamento*, della durata di 7 giorni, gli animali venivano divisi in tre gruppi randomizzati in base al loro peso corporeo e stabulati in gabbie singole standard (gruppo *Controlli* e gruppo *Ristretti*) o in gabbie dotate di ruota (gruppo *ABA*). Durante questa fase i ratti appartenenti al gruppo *ABA* non avevano libero accesso alle ruote, ma entravano comunque in contatto con esse affinché non si instaurassero comportamenti di evitamento causati da possibili reazioni di neofobia. Gli animali dei gruppi *Controlli*, *Ristretti* e *ABA* ricevevano cibo *ad libitum*. Dopo questa fase, le ruote venivano sbloccate e i ratti *ABA* avevano libero accesso ad esse 24/24 h. Durante questa fase, detta di *adattamento*, venivano monitorati giornalmente i seguenti parametri sperimentali:

- il peso corporeo
- la quantità di cibo consumato
- l'attività fisica giornaliera per le sole ratte *ABA* che avevano la ruota a disposizione. Tale parametro veniva espresso come numero di giri effettuati con la ruota (running wheel activity: RWA)

Questi parametri sono stati monitorati per poter ottenere dei valori basali (BL) di partenza stabili. Durante queste fasi acqua e cibo standard da laboratorio sono stati dispensati in regime *ad libitum*.

2.3.1 *Induzione del modello activity-based anorexia*

Al settimo giorno della fase di *adattamento*, all'inizio del periodo di buio, viene rimosso il cibo ai ratti *Ristretti* ed *ABA* ed ha inizio la fase di *induzione* della durata di sei giorni. Durante questa fase, i ratti del gruppo *Controlli* ricevevano il cibo 24/24 h e non avevano accesso alla ruota. Le ratte del gruppo *Ristretti* e *ABA* ricevevano il cibo per 90 minuti al giorno ed il gruppo *ABA* aveva inoltre libero accesso alla ruota. Durante questa fase le ratte del gruppo *Ristretti* e *ABA* non possono perdere più del 25 % del loro peso basale (riferito all'ultimo giorno della fase di *adattamento*) e sono soggette ad una restrizione di cibo di tipo temporale e non quantitativo. Questa restrizione consiste nel ricevere una quantità pesata di cibo per un periodo di tempo limitato, che coincide con i primi 90 minuti della fase di buio. Durante questo lasso di tempo le ratte *ABA* non hanno accesso alla ruota che viene bloccata per evitare una possibile competizione tra consumo di cibo e attività fisica. Il peso corporeo, l'assunzione di cibo delle 24 ore (solo nel gruppo *Controlli*) e gli RWA (solo per il gruppo *ABA*) venivano monitorati giornalmente nei 30 minuti antecedenti i 90 minuti di accesso al cibo.

Al terzo e al sesto giorno della fase di *induzione*, chiamate rispettivamente *fase precoce* e *fase tardiva*, gli animali sono stati sacrificati e le aree cerebrali di interesse prelevate per le successive analisi biomolecolari. Gli studi biomolecolari condotti in questa fase sono volti a valutare possibili alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico dei principali componenti del sistema endocannabinoide, in particolar modo possibili variazioni nell'espressione genica e nello stato di metilazione dei geni presi in esame.

2.3.2 *Real-time qPCR (RT-qPCR)*

L'RNA totale è stato isolato dall'area cerebrale (Hyp, NAcc, PFC) secondo il metodo modificato di Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 2006). La purezza e la quantità di RNA estratto è stata verificata mediante lo strumento NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), mentre la sua integrità è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio. La sintesi del cDNA per le reazioni di RT-PCR è stata effettuata mediante il kit di sintesi RevertAid H Minus First Strand cDNA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La quantità relativa ad ogni tipologia di mRNA è stata valutata con il metodo della RT-qPCR utilizzando

SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline) on a DNA Engine Opticon 2 Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research, Waltham, MA, USA). Un microlitro del primo filamento di cDNA ottenuto è stato utilizzato per l'amplificazione in duplicato in 15 µl di soluzione di reazione contenente 7 µl di Sybr Green Kit e 330 nM di ogni primer. La quantificazione esatta del target iniziale in ogni reazione di PCR è ottenuta mediante l'esame del grafico di amplificazione, con l'individuazione di un valore soglia per la quantità di DNA che ricada nella fase precoce esponenziale della PCR e viene stabilito mediante l'individuazione di un valore soglia di fluorescenza sopra il background, definito come C_t ovvero il ciclo soglia (cycle threshold). Differenze nel numero di C_t sono state usate per quantificare la quantità di target contenuto in ogni tubo. Dopo la pCR, viene costruita una curva di dissociazione (*melting curve*) in un intervallo di temperatura che va dai 60 ai 90° per valutare la specificità dei prodotti di amplificazione. La relativa espressione dei differenti ampliconi è stata calcolata mediante il metodo delta-delta C_t (DDCt) e per l'analisi statistica viene convertita nella relativa espressione: $2^{(-DDCt)}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Tutti i dati sono stati normalizzati rispetto al gene endogeno gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e b-actina (bACT). I primers usati per la amplificazione PCR sono riportati nella tabella 2.

2.3.3 *Analisi della metilazione del DNA*

Lo stato di metilazione nella regione promotrice del gene *Cnr1*, nel tessuto cerebrale dei ratti, è stata effettuata mediante l'uso del pirosequenziamento utilizzando il bisolfato per convertire il DNA. Dopo l'estrazione, 0.5 µg di DNA proveniente da ogni campione viene trattato con bisolfito, utilizzando EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA). Il DNA trattato con bisolfito viene amplificato mediante PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordo con il protocollo fornito. Le condizioni sperimentali per l'analisi mediante PCR son state le seguenti: 95°C per 15 minuti seguiti da 45 cicli di 94 °C per 30 secondi, 56 °C per 30 secondi, 72 °C per 30 secondi e infine 72 °C per 10 minuti. I prodotti di PCR sono stati poi verificati e analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'analisi mediante pirosequenziamento delle metilazione è stato condotto usando PyroMark Q24 (Qiagen). Il livello di metilazione è stato analizzato mediante PyroMark Q24 Software (Qiagen,

Hilden, Germany), il quale calcola le percentuali di metilazione ($mC/(mC + C)$) per ogni sito CpG, permettendo quindi una comparazione quantitativa (mC è citosina metilata, C citosina non metilata). Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti:
forward: 5'-GGAAGAGAGTAGGAAGATGATAG-3; reverse: 5'-
biotinTTCTACCAAACTAATATACCTAACACC-3'; sequencing: 5'-
AGAGAGTAGGAAGATGATAGT-3'.

2.3.4 Immunoblotting

I tessuti sono stati omogenati in un buffer freddo di lisi composto da: 1M Tris-HCl (pH 8), 2M cloruro di sodio, 0.5M cloruro di magnesio, 0.1 M fluoruro di sodio, 0.5 M EDTA (pH 8), 10% glicerolo, 1% Triton X-100, inibitore delle proteasi 100x. Il contenuto proteico è stato determinato mediante il saggio proteico di Bradford utilizzando Bio-Rad Reagent. Per l'analisi mediante Western Blot, una quantità uguale di proteine (20 ug/lane) viene fatta correre su un gel di poliacrilammide (12%) e l'elettroblotting è stato effettuato in una membrana di polivinilidene fluoruro (Amersham Biosciences). Le membrane sono state bloccate con 5% di siero albumina bovina in tris-buffered saline-Tween (TBST) per 2 ore seguito da altre due ore di incubazione in una soluzione contenente 5% latte (w/vol) in TBS-tween. Dopodiché avviene la reazione di immunoblotting in cui i campioni sono stati incubati con l'anticorpo policlonale anti-CB1, diluito 1:200 (Cayman), e con l'anticorpo monoclonale anti-GAPDH (Cell Signaling Technology) diluito 1:5000 ad una temperatura di 4°C per tutta la notte. Il giorno successivo le membrane sono state lavate nuovamente per 3 volte con TBST ed incubate con anticorpo secondario coniugato con HRP (Thermo Scientific) diluito 1:10000 per un ora a temperatura ambiente. Il rilevamento delle bande immnureattive è stato eseguito usando il sistema Bio-Rad Chemiluminescence System utilizzando Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent.

GENE	FORWARD	REVERSE
<i>β-ACTIN</i>	AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>GAPDH</i>	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT
<i>CNR1</i>	TTCCACCGTAAAGACAGCCC	TCCACATCAGGCAAAGGCC
<i>CNR2</i>	TTGACCGATACCTATGTCTGTGC	TGCTTTCCAGAGGACATACCC
<i>TRPV1</i>	ATTGAACGGCGGAACATGACG	ATCTCTCCAGCTTCAGCG
<i>FAAH</i>	ATGGAAGTCCTCCAAGAGC	TAGAGCTTTCAGGCATAGCG
<i>NAPE-PLD</i>	TGTCCCGGGTTCCAAAGAGGAGC	ACCATCAGCGTCGCGTGTCC
<i>MAGL</i>	ATGTTGAAGAGGCTGGACATGC	ATGCAGATTCCGGATTGGC
<i>DAGL</i>	ATTCTCTCCTTCCTCCTGC	ATTTGGGCTTGGTGCTTCG

Tabella 2. Sequenze di primers utilizzati per le analisi di RT-qPCR nel tessuto cerebrale di ratto.

2.4 Esperimento 2: Livelli DA, DOPAC e HVA e densità dei recettori D2

Come mostrato nella figura 17, per le analisi biochimiche è stato utilizzato un protocollo sperimentale ABA che prevedeva l'inserimento della fase di *recovery*. Infatti, esso consisteva in 4 fasi sequenziali: *acclimatamento* (7 giorni), *adattamento* (7 giorni), *induzione* (6 giorni), *recovery* (7 giorni).



Figura 17. Rappresentazione schematica del protocollo ABA utilizzato per gli studi biochimici.

La fase di *acclimatamento* applicata in questo esperimento segue il protocollo descritto nell'esperimento 1.

2.4.1 *Induzione del modello activity-based anorexia*

La fase di restrizione alimentare ha avuto la durata di sei giorni ed è indicata come *induzione*. Al giorno 6 di *induzione*, una parte degli animali è stata sacrificata per il prelievo delle aree cerebrali per le misurazioni dei livelli di DA e dei suoi due metaboliti: DOPAC (acido 3,4-diidrossifenilacetico) ed HVA (acido omovanillico). Un'altra parte di animali è stata sacrificata e il cervello prelevato per la misurazione della densità dei recettori D2.

2.4.2 *Fase di recovery del modello activity-based anorexia*

Al termine della fase di *induzione*, i restanti animali iniziavano la fase di *recovery* (7 giorni). Al sesto giorno della fase di *induzione*, dopo i 90 minuti di accesso al cibo, gli animali del gruppo *ABA* accedevano ad una fase in cui sono sottoposti ad un regime alimentare *ad libitum* e libero accesso alla ruota (Dixon *et al.*, 2003; Ratnovsky e Neuman, 2011). In questa fase, veniva monitorato giornalmente il recupero del peso corporeo per il gruppo *ABA*, così come l'attività fisica (RWA) e l'assunzione di cibo nell'arco delle 24 ore. Peso corporeo e consumo di cibo sono stati monitorati giornalmente anche per il gruppo dei *Controlli*. Tali parametri venivano registrati 30 minuti prima dell'inizio della fase di buio. Come descritto per la fase di *induzione*, nell'ultimo giorno della fase di *recovery* gli animali sono stati sacrificati poco prima dell'inizio della fase di buio. Una parte degli animali è stata sacrificata e le aree cerebrali prelevate per le misurazioni di DA e dei suoi metaboliti. Un'altra parte di animali è stata sacrificata e il cervello *in toto* prelevato per la misurazione della densità dei recettori D2.

2.4.3 *Misurazione dei livelli di neurotrasmettitori*

Una volta sacrificati gli animali mediante decapitazione, le aree cerebrali di interesse (CPu, NAcc, PFC, Hyp) sono state rapidamente dissezionate e congelate in ghiaccio secco a -80°C fino alle analisi successive. Per la misurazione della concentrazione di DA dei suoi metaboliti DOPAC e HVA, i campioni di tessuto sono stati pesati ed omogenati in 0.1 M di HClO₄ alla temperatura di 4 °C (1:20 di tessuto pesato per volume di solvente). Dopo l'omogeneizzazione i campioni sono stati

centrifugati (23'000 g, 30 minuti), è stato estratto il surnatante e successivamente centrifugato per poter essere filtrato mediante l'utilizzo di tubi dotati di filtro 0.22 µm Spin-X Centrifuge Tube Filter (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY) e successivamente iniettati nel sistema di HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dotato di una colonna C18 (LC18 DB Supelco, 5 µm, 4.6 X 150 mm) e del rilevatore Coulochem III (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). Il primo elettrodo della cella analitica del rilevatore è stato settato a +20 mV ed il secondo a +320 mV, la temperatura impostata per colonna è di 26 °C. La fase mobile è composta da 50 mM di acetato di sodio (pH 4.2), 0.7 mM EDTA, 0.35 mM di sodio ottano sulfurico (OSA) e metanolo al 10%. Il flusso viene mantenuto costante con un volume di 1 mL al minuto. La DA con i rispettivi metaboliti, sono stati quantificati con la comparazione dell'area dei picchi ottenuti, con lo standard. I valori ottenuti sono stati poi analizzati mediante il programma EZchrom SI, e poi successivamente espressi come ng/mg di tessuto pesato.

2.4.4 *Studi di binding recettoriale*

I cervelli *in toto* sono stati rapidamente prelevati, immersi in isopentano e conservati a -80 °C prima di essere preparati ed utilizzati per gli studi autoradiografici. Le sezioni coronali cerebrali, dello spessore di 12 µm, sono state ottenute utilizzando un criostato (Leica C3050S), montate su vetrini Superfrost Plus slides (BDH, Lutterworth, UK) e conservate, con l'aggiunta di un dissecante, alla temperatura di -20 °C fino al successivo utilizzo. Le aree cerebrali considerate ed analizzate in questi esperimenti, secondo l'Atlante Paxinos e Watson (1997), sono:

1. Caudato Putamen (CPu) (AP: +1.60)
2. Nucleus Accumbens Core (NAcc Core) e Shell (NAcc Shell) (AP: +1.60)

Gli esperimenti di autoradiografia recettoriale per l'individuazione anatomica dei recettori D2 sono stati effettuati utilizzando il protocollo sperimentale di Barros 2004 con apportate alcune modifiche (Barros *et al.*, 2004). Le sezioni sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora in tampone 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) contenente 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 nM di [³H]YM-09151-2 (attività specifica: 83.1 Ci/mmol; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Per determinare il binding non specifico le sezioni cerebrali adiacenti son state incubate alla stesse

condizioni con l'aggiunta di 30 μ M di Sulpiride. Al termine dell'incubazione, le sezioni sono state lavate per due volte consecutive in tampone Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) a 4 °C. L'ultimo lavaggio è stato fatto in acqua milliQ a 4 °C e le sezioni sono state fatte asciugare all'aria. Una volta che le sezioni di tessuto cerebrale sono completamente asciutte, sono state posizionate insieme agli standard [3 H]micro-scales (RPA 501 and 505, Amersham) per il [3 H](-)-YM-09151-2 nella cassetta Fujifilm BAS ed esposte con la lastra autoradiografica BAS-5000. Le immagini ottenute sono state acquisite ed analizzate con il sistema Fujifilm-BAS 5000 (AIDA, Raytest, USA): le densità ottiche (ODs) sono state trasformate nei livelli di radioattività legata (fentomoli per mg di proteine) tramite i valori di grigio generati dalla co-esposizione degli standard per il [3 H].

2.5 Esperimento 3: fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia e analisi delle componenti lipidiche plasmatiche negli animali

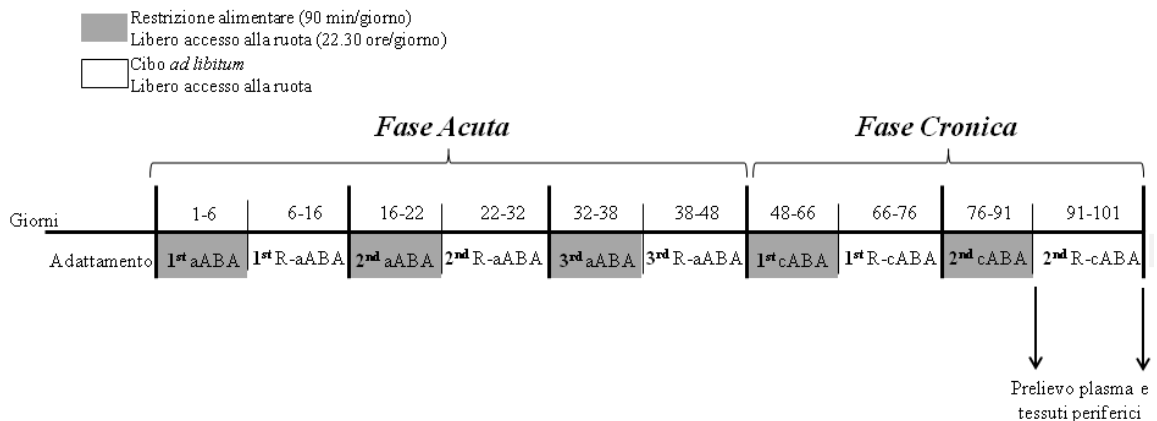


Figure 18. Rappresentazione del disegno sperimentale utilizzato. I riquadri in grigio rappresentano le fasi di *induzione*, mentre quelle in bianco le fasi di *recovery*.

La fase di adattamento è stata condotta come precedentemente descritto negli esperimenti 1 e 2. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali: il gruppo dei *Controlli* ed il gruppo *ABA*. Questo protocollo utilizza due diverse fasi: una fase acuta ed una fase cronica.

2.5.1 Fase acuta del protocollo activity-based anorexia

La fase acuta di questo protocollo sperimentale era costituita da un periodo di *induzione* del modello ABA e da un successivo periodo di recupero del peso corporeo (*recovery*), che si ripetono alternandosi per tre volte consecutive.

Le tre fasi di *induzione*, sono state nominate *aABA* ovvero “acute ABA” (fase acuta del protocollo ABA), e indicate come: *1st aABA*, *2nd aABA* e *3rd aABA*. Nelle fasi acute di *induzione*, sempre della durata di sei giorni ciascuna, i ratti ABA sono stati sottoposti ad un regime alimentare restrittivo con accesso al cibo per 90 minuti al giorno, durante i quali veniva bloccata la ruota per evitare competizione fra corsa ed assunzione di cibo (come nei protocolli precedenti). Per il resto della giornata, 22.5 ore, gli animali ABA avevano libero accesso alla ruota. Ai *Controlli* veniva offerto cibo *ad libitum* per tutte le fasi sperimentali. Giornalmente sono stati monitorati i seguenti parametri: peso corporeo, attività fisica giornaliera (per gli animali ABA), cibo consumato nell’arco delle 24 ore (per i *Controlli*) e nell’arco dei 90 minuti (per gli animali ABA).

Le tre fasi di *recovery* sono state nominate *R-aABA*, ovvero “recovery from acute ABA” (*recovery* dalla fase acuta del protocollo ABA) e indicate come: *1st R-aABA*, *2nd R-aABA* e *3rd R-aABA*. Nelle fasi di *recovery*, che hanno avuto inizio al sesto giorno di ogni fase acuta di *induzione*, è stato ripristinato nei ratti ABA, un regime *ad libitum* di consumo di cibo e di libero accesso alla ruota. I ratti del gruppo *Controlli* ricevevano sempre cibo *ad libitum*. In ogni fase di *recovery* della durata di 10 giorni venivano monitorati i parametri sopraelencati (Dixon *et al.*, 2003; Ratnovsky e Neuman, 2011).

2.5.2 Fase cronica del protocollo activity-based anorexia

L’ultimo giorno della *3rd R-aABA*, all’inizio della fase di buio, veniva rimosso il cibo ai ratti ABA ed iniziava la fase di *induzione* cronica del modello. Le fasi di *induzione* cronica hanno preso il nome di *cABA* ovvero “chronic ABA” (fase cronica del protocollo ABA) rispettivamente suddivise in *1st cABA* e *2nd cABA*. Le fasi di *recovery*, denominate *R-cABA* ovvero “recovery from chronic ABA” (*recovery* dalla fase cronica del protocollo ABA), sempre della durata di dieci giorni, venivano suddivise in *1st R-cABA* e *2nd R-cABA*. Le fasi di *induzione* cronica avevano un’unica differenza rispetto alle fasi di *induzione* acuta: gli animali potevano accedere alla fase di *recovery*

successiva solo alla dimostrata perdita del 20-25% del peso corporeo basale, riferito all'ultimo giorno della fase di *recovery* precedente. Per questo motivo, il decorso delle fasi croniche di *induzione* è variato in relazione al tempo impiegato dagli animali per perdere la percentuale di peso richiesta. Pertanto, la durata non è sempre stata di 6 giorni come nelle fasi acute descritte negli altri esperimenti. Anche in questa fase sperimentale i ratti di controllo ricevevano cibo *ad libitum* ed i ratti *ABA* una restrizione di cibo temporale seguendo le stesse caratteristiche delle fasi acute descritte sopra. Al termine della 2nd *cABA* e della 2nd *R-cABA* gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati il plasma ed i tessuti periferici per le successive analisi.

2.5.3 *Misurazione degli acidi grassi nel plasma al termine della fase cronica del protocollo activity-based anorexia*

Al termine di entrambe le 2nd *cABA* e 2nd *R-cABA* gli animali sono stati sacrificati prima della fase di buio e prelevati il fegato e due regioni del tessuto adiposo: il tessuto adiposo sottocutaneo (TAS) localizzato alle base delle anche (Cinti, 2005) e il tessuto adiposo viscerale (VAT) composto dal tessuto adiposo perirenale e dal tessuto adiposo ovarico. I tessuti vengono prelevati e pesati e conservati a -80°C fino alla successiva analisi.

Dopo l'estrazione dei lipidi totali mediante il metodo di Folch (Folch *et al.*, 1956), è stata quantificata la quantità totale di lipidi usando il metodo Chiang (Chiang *et al.*, 1957). Successivamente, sono state prelevate delle aliquote della frazione lipidica e saponificate per poter ottenere la componente degli acidi grassi liberi (FFA) per la successiva analisi mediante HPLC (Banni *et al.*, 1996). I reagenti utilizzati per l'HPLC sono stati acquistati dalla Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). La separazione degli acidi grassi è stata effettuata con un sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) settata con un rivelatore a serie di diodi. La colonna cromatografica per la rilevazione degli acidi grassi insaturi é una Chrompack a fase inversa (150mmx4.6mm, inertsil 5 ODS-2, 5mm I.D.) e la fase mobile utilizzata é una miscela: acetonitrile/H₂O/acido acetico (70/30/0.12 v/v/v) ad un flusso di 1.5ml/min (Banni e Di Marzo, 2010). Gli acidi grassi insaturi non coniugati sono stati rilevati a 200nm, gli acidi grassi insaturi coniugati sono stati rilevati a 234nm.

L'eluato analizzato ad uno spettro di 195-215 nm, è stato ottenuto ogni 1.28 secondi. I secondi derivati dallo spettro UV dell'acido grasso diene coniugato, sono stati ottenuti usando Phoenix 3D HP Chemstation software (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Questo spettro è stato acquisito per confermare l'identificazione dei picchi ottenuti mediante HPLC (Artmann *et al.*, 2008). Gli acidi grassi saturi (SFAs) sono stati misurati come esteri metilici degli acidi grassi (FAMEs) mediante il gascromatografo (Agilent, Model 6890, Palo Alto, CA, USA) dotata di porta di iniezione con un rapporto di divisione di 20:1, un rilevatore del flusso ionico (FID) e un auto campionatore (Agilent, Model 7673, Palo Alto, CA, USA), una colonna capillare (100m x 0,25 mm I.D., 0,20 µm film spessore). I dati sono stati poi analizzati mediante il sistema software Agilent ChemStation.

2.6 Analisi statistica

Tutti i risultati sono espressi come media \pm SEM. I livelli di DA, DOPAC, HVA e la densità dei recettori D2 sono stati espressi come percentuale rispetto ai *Controlli*. Le differenze statistiche sono state ottenute mediante il test statistico ANOVA ad una e a due vie, seguiti quando necessario dai test non parametrico Kruskal-Wallis, e dal test *post-hoc* di Bonferroni. L'analisi mediante l'unpaired t-test di Student's è stata applicata per valutare la differenza statistica tra due soli gruppi o condizioni sperimentali. Nella figura 25, i dati sono stati equiparati utilizzando il coefficiente di correlazione per ranghi di Serman. Tutti i test statistici sono stati effettuati mediante il programma statistico GraphPad Prism® versione 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Sono state considerate significative le differenze con $p < 0.05$.

3 Capitolo 3. Risultati

3.1 Esperimento 1: studi di espressione genica e di regolazione epigenetica

3.1.1 Dati comportamentali induzione del modello activity-based anorexia: fase precoce

Come mostrato nella figura 19 A, i ratti sottoposti a regime di restrizione alimentare combinato con libero accesso alla ruota mostrano, già al terzo giorno di *induzione*, un importante perdita di peso rispetto al gruppo dei *Controlli*. L'analisi statistica ANOVA a due vie mette in rilievo questa differenza, con una significatività nell'interazione gruppi x tempo [$F_{(6,30)}=187.8, p<0.001$]. Nella figura 19 B viene mostrato il consumo di cibo e l'analisi statistica presenta una differenza significativa tra i gruppi [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo [$F_{(4,20)}=81.46, p<0.001$]. Nella figura 19 C è riportata l'attività fisica dei ratti ABA, come possiamo osservare dal grafico essa aumenta rispetto all'attività fisica basale (BL) riferita al giorno 0 [ANOVA ad una via $F_{(3,23)}=7.023, p<0.001$].

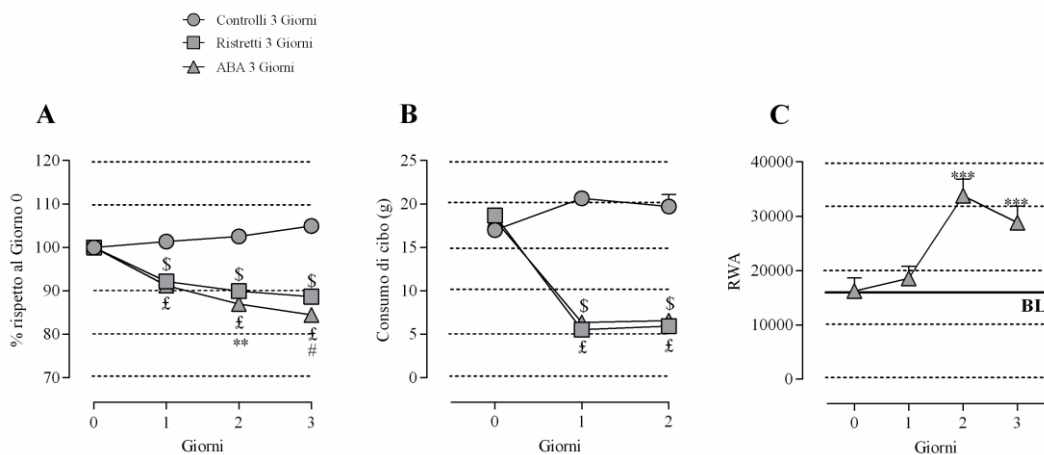


Figura 19. Rappresentazione del **A)** peso corporeo espresso in percentuale rispetto al giorno 0; **B)** consumo di cibo e **C)** attività fisica giornaliera (RWA) al termine della *fase precoce* dell'*induzione*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=6$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: **A)** \$ $p<0.0001$ *Controlli 3 Giorni vs Ristretti 3 Giorni*; £ $p<0.0001$ *Controlli 3 Giorni vs ABA 3 Giorni*; # $p<0.0001$ *Ristretti 3 Giorni vs ABA 3 Giorni* per il giorno 3; ** $p<0.01$ *Ristretti 3 Giorni vs ABA 3 Giorni* per il giorno 2; **B)** \$ $p<0.0001$ *Controlli 3 Giorni vs Ristretti 3 Giorni*; £ $p<0.0001$ *Controlli 3 Giorni vs ABA 3 Giorni*; **C)** *** $p<0.001$ *Giorni 2,3 vs Giorno 0*.

3.1.2 Dati comportamentali induzione del modello activity-based anorexia: fase tardiva

Come mostrato nella figura 20 A, i ratti ABA, mostrano un'importante perdita di peso rispetto al gruppo dei *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(12,60)} = 87.22, p < 0.0001$]. Nella figura 20 B viene presentato il consumo di cibo che risulta minore nei gruppi ABA e *Ristretti*, rispetto ai *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(10,50)} = 7.576, p < 0.001$]. Nella figura 20 C è riportata l'attività fisica dei ratti ABA, essa aumenta rispetto all'attività fisica basale (BL) riferita al giorno 0 [test ANOVA ad una via $F_{(6,41)} = 7.145, p < 0.001$].

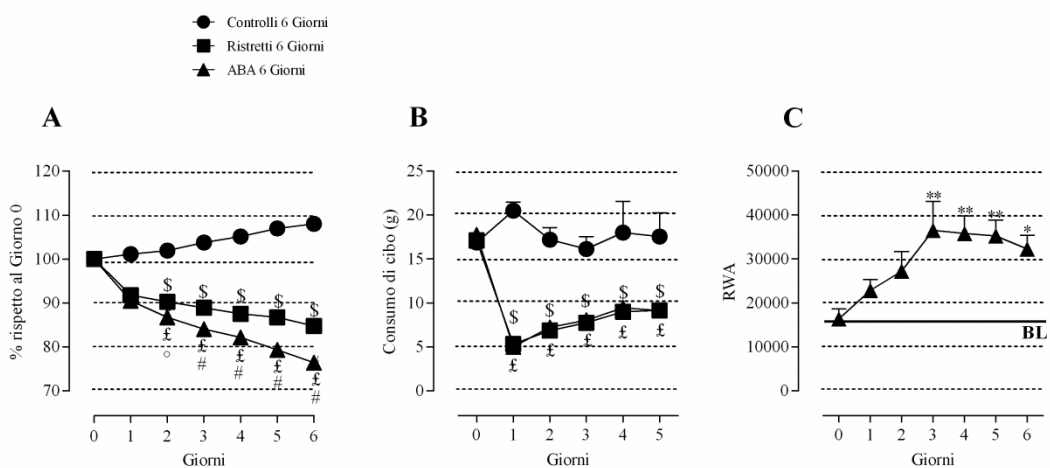


Figura 20. Rappresentazione del **A)** peso corporeo espresso in percentuale rispetto al giorno 0; **B)** assunzione di cibo e **C)** attività fisica giornaliera (RWA) al termine della *fase tardiva* dell'*induzione*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=6$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: **A)** \$ $p < 0.0001$ *Controlli 6 Giorni vs Ristretti 6 Giorni*; £ $p < 0.0001$ *Controlli 3 Giorni vs ABA 3 Giorni*; ° $p < 0.001$ *Ristretti 6 Giorni vs ABA 6 giorni* per il giorno 2, # $p < 0.0001$ *Ristretti 6 Giorni vs ABA 6 Giorni* per i giorni 3, 4, 5, 6; **B)** \$ $p < 0.0001$ *Controlli 6 Giorni vs Ristretti 6 Giorni*; £ $p < 0.0001$ *Controlli 6 Giorni vs ABA 6 Giorni*; **C)** * $p < 0.05$ *Giorno 6 vs Giorno 0*; ** $p < 0.05$ *Giorni 3, 4, 5 vs Giorno 0*.

3.1.3 *Analisi genetiche ed epigenetiche delle componenti del sistema endocannabinoide al termine della fase precoce e tardiva del protocollo activity-based anorexia*

Per valutare se il regime di restrizione alimentare combinato con l'intensa attività fisica potesse influenzare e regolare la trascrizione genica del sistema endocannabinoide, abbiamo voluto analizzare l'espressione genica misurando l'mRNA dei principali componenti endocannabinoidegici e mediante lo studio delle metilazioni del DNA abbiamo analizzato una possibile modulazione genica di queste componenti prese in esame. Nella tabella 3 (A, B, C) sono riportati i livelli di mRNA dei vari componenti del sistema endocannabinoide analizzati nelle diverse aree cerebrali prese in esame. Nelle figure 21 e 22 è riportata nello specifico l'espressione genica del gene *Cnr1* nell'Hyp e nel NAcc degli animali in tutti i gruppi sperimentali (*Controlli*, *Ristretti*, *ABA*) al termine di entrambe le fasi del protocollo ABA. L'analisi statistica mediante test ANOVA a due vie ha mostrato che l'esposizione al modello ABA, non determina cambiamenti in quasi tutti i componenti del sistema endocannabinoide nell'Hyp, nella PFC e nel NAcc (Tabella 3 A, B, C). Un'alterazione selettiva dell'espressione del gene *Cnr1* nell'Hyp e nel NAcc è stata osservata nei ratti *ABA* al termine della *fase tardiva* del protocollo. L'analisi statistica ANOVA a due vie ha mostrato che i livelli di mRNA nell'Hyp risultano alterati sia nei ratti *Ristretti* che *ABA* [$F_{(2,28)}=9.71$, $p<0.001$] ma questa modificazione non è dovuta al tempo [$F_{(1,28)}=0.001$, $p=0.99$]. Inoltre, non risulta esserci interazione significativa tra regime alimentare e fattore tempo [$F_{(2,28)}=0.43$, $p=0.655$]. Nel NAcc, il test statistico ANOVA a due vie, ha messo in evidenza, invece, che i livelli di mRNA sono modificati sia dal regime alimentare [$F_{(2,29)}=8.39$, $p<0.01$] sia dal tempo [$F_{(1,29)}=5.49$, $p=0.03$], senza un'interazione significativa fra questi due fattori [$F_{(2,29)}=0.75$, $p=0.482$].

A. Hyp	Fase Precoce			Fase Tardiva		
	Controlli	Ristretti	ABA	Controlli	Ristretti	ABA
<i>Cnr1</i>	1.01 ± 0.07	0.66 ± 0.11	0.48 ± 0.13	1.11 ± 0.24	0.92 ± 0.26	0.58 ± 0.27 *
<i>Cnr2</i>	1.13 ± 0.25	0.71 ± 0.14	0.71 ± 0.20	1.17 ± 0.30	4.14 ± 1.05	2.58 ± 0.38
<i>Faah</i>	1.04 ± 0.13	1.13 ± 0.17	1.46 ± 0.60	1.25 ± 0.33	0.82 ± 0.18	0.82 ± 0.14
<i>Trpv1</i>	1.46 ± 0.61	0.72 ± 0.13	0.51 ± 0.13	1.19 ± 0.30	0.57 ± 0.10	0.46 ± 0.05
<i>Magl</i>	1.09 ± 0.21	0.93 ± 0.23	1.10 ± 0.30	1.21 ± 0.28	1.11 ± 0.14	1.11 ± 0.61
<i>Dagl</i>	1.13 ± 0.21	0.95 ± 0.19	1.40 ± 0.55	1.22 ± 0.28	0.77 ± 0.15	0.69 ± 0.23
<i>Nape-pld</i>	1.13 ± 0.24	0.95 ± 0.22	0.94 ± 0.21	1.16 ± 0.29	1.16 ± 0.16	1.30 ± 0.47

B. NAcc	Fase Precoce			Fase Tardiva		
	Controlli	Ristretti	ABA	Controlli	Ristretti	ABA
<i>Cnr1</i>	1.04 ± 0.12	1.24 ± 0.23	0.70 ± 0.23	1.01 ± 0.06	0.70 ± 0.09	0.44 ± 0.06 *
<i>Cnr2</i>	1.32 ± 0.47	1.02 ± 0.16	0.83 ± 0.20	1.09 ± 0.17	0.73 ± 0.14	0.58 ± 0.07
<i>Faah</i>	1.10 ± 0.20	1.18 ± 0.10	0.96 ± 0.05	1.03 ± 0.12	1.45 ± 0.26	1.38 ± 0.10
<i>Trpv1</i>	1.24 ± 0.42	0.85 ± 0.10	0.74 ± 0.14	1.03 ± 0.12	0.78 ± 0.13	0.68 ± 0.13
<i>Magl</i>	1.01 ± 0.07	0.92 ± 0.11	1.06 ± 0.10	1.01 ± 0.06	1.37 ± 0.20	1.17 ± 0.05
<i>Dagl</i>	1.11 ± 0.21	0.97 ± 0.03	1.08 ± 0.14	1.01 ± 0.06	2.41 ± 0.32	2.23 ± 0.12
<i>Nape-pld</i>	1.08 ± 0.16	1.06 ± 0.15	0.88 ± 0.08	1.02 ± 0.08	0.74 ± 0.08	0.66 ± 0.11

C. PFC	Fase Precoce			Fase Tardiva		
	Controlli	Ristretti	ABA	Controlli	Ristretti	ABA
<i>Cnr1</i>	1.03 ± 0.11	1.09 ± 0.09	1.36 ± 0.19	1.02 ± 0.08	0.89 ± 0.13	0.75 ± 0.15
<i>Cnr2</i>	1.03 ± 0.10	1.47 ± 0.40	1.61 ± 0.20	1.03 ± 0.11	1.24 ± 0.21	2.03 ± 0.59
<i>Faah</i>	1.07 ± 0.18	1.03 ± 0.17	1.30 ± 0.28	1.06 ± 0.15	1.13 ± 0.13	1.77 ± 0.35
<i>Trpv1</i>	1.05 ± 0.15	1.03 ± 0.16	0.87 ± 0.14	1.58 ± 0.70	0.93 ± 0.25	0.80 ± 0.17
<i>Magl</i>	1.02 ± 0.09	1.07 ± 0.19	0.88 ± 0.07	1.02 ± 0.08	1.04 ± 0.15	0.83 ± 0.13
<i>Dagl</i>	1.05 ± 0.13	0.97 ± 0.18	2.07 ± 0.58	1.06 ± 0.16	1.25 ± 0.21	2.00 ± 0.56
<i>Nape-pld</i>	1.13 ± 0.29	0.84 ± 0.07	3.77 ± 1.56	1.33 ± 0.45	2.31 ± 0.88	2.62 ± 0.90

Tabella 3. Livello di espressione genica dei componenti del sistema endocannabinoide rispettivamente nelle aree cerebrali Hyp (A), NAcc (B) e PFC (C). I livelli dell'mRNA sono stati normalizzati rispetto ai geni di controllo interno β -actina e GAPDH. i dati sono espressi come media ± SEM ($n=5-7$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: * $p<0.05$ ABA vs Controlli.

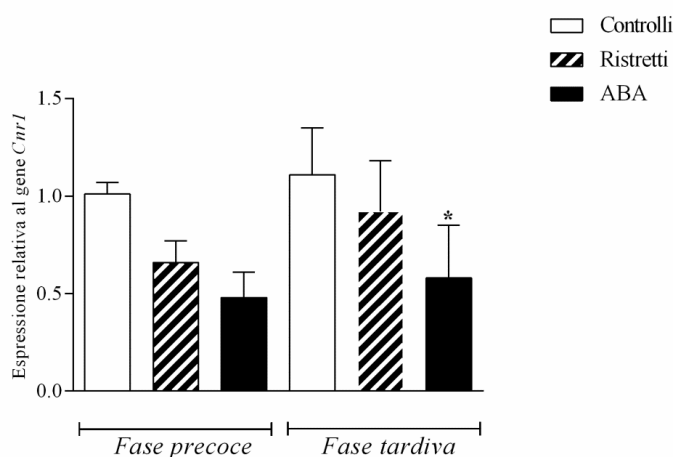


Figura 21. Espressione genica del gene *Cnr1* nell'Hyp dei ratti *Controlli*, *Ristretti* e *ABA* al termine della *fase precoce* e *tardiva* dell'induzione del modello ABA, riportata come valore di 2^{-DDCt} calcolato mediante il metodo Delta-Delta Ct (DDCt) vs gli animali *Controlli* posti uguali a 1. L'espressione genica è stata normalizzata rispetto al GAPDH e alla β -actina, i dati sono espressi come media \pm SEM ($n=5-7$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: * $p < 0.05$ ABA vs *Controlli*.

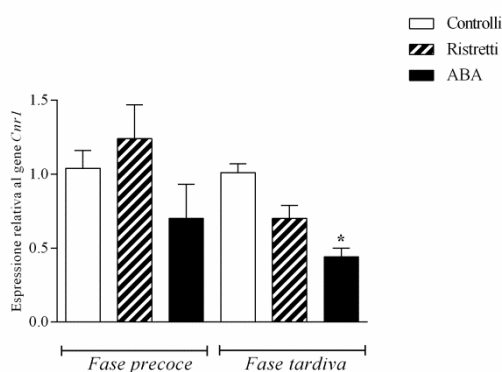


Figura 22. Espressione genica del gene *Cnr1* nel NAcc dei ratti *Controlli*, *Ristretti* e *ABA* al termine della *fase precoce* e *tardiva* dell'induzione del modello ABA, riportata come valore di 2^{-DDCt} calcolato mediante il metodo Delta-Delta Ct (DDCt) vs gli animali *Controlli* posto uguali a 1. L'espressione genica è stata normalizzata rispetto al GAPDH e alla β -actina, i dati sono espressi come media \pm SEM ($n=5-7$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni * $p < 0.05$ ABA vs *Controlli*.

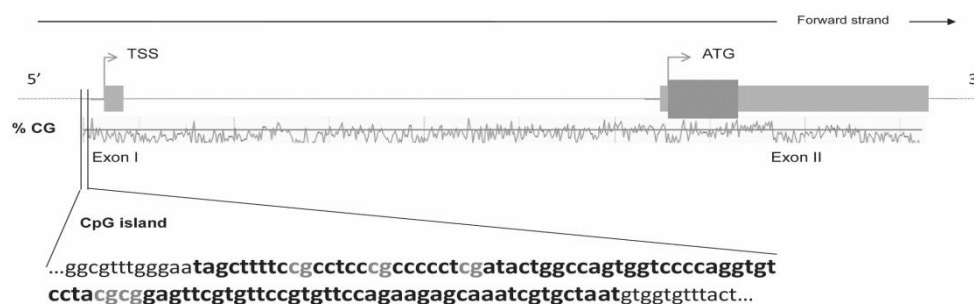


Figura 23. Struttura genica del genere *Cnr1* nel ratto raffigurante le isole CpG oggetto di studio. Sono inoltre indicate la posizione del codone di inizio della traduzione (ATG), il sito di inizio della trascrizione (TSS), gli esoni (I e II) e gli introni.

Per poter valutare un eventuale correlazione tra le alterazioni osservate nell'espressione genica di *Cnr1* e la regolazione epigenetica, abbiamo analizzato la metilazione del DNA nella regione promotrice del gene *Cnr1*, la cui struttura è rappresentata in figura 23.

Nell'Hyp non sono apparse evidenze significative a livello di metilazione nei due siti CpG esaminati nella regione promotrice del gene *Cnr1*, né in ogni singolo sito esaminato, sia nel gruppo di ratti *ABA* che nel gruppo dei *Ristretti* e dei *Controlli* (Tabella 4A e 4B). Nel NAcc il significativo aumento della percentuale di metilazione del DNA è stato riscontrato negli animali *ABA* rispetto agli animali del gruppo *Controlli* nel primo e nel secondo sito CpG, come anche nel complesso di tutti i siti CpG presi in considerazione (average) al termine della *fase tardiva* ma non al termine della *fase precoce* (figura 24). Una significativa correlazione inversa è stata riscontrata inoltre tra l'espressione del gene ed i livelli di metilazione del DNA nel primo sito CpG analizzato ($p=0.037$, coefficiente di Spearman $r=-0.6105$, figura 25 A) e nell'average di tutti i siti CpG ($p=0.020$, coefficiente di Spearman $r=-0.6713$, figura 25 B) ma non nel secondo sito CpG analizzato ($p=0.148$, coefficiente di Spearman $r=-0.441$, figura 25 C).

A. Hyp	Fase Precoce			Fase Tardiva		
CpG site	Controlli	Ristretti	ABA	Controlli	Ristretti	ABA
1	4.40 ± 0.61	6.73 ± 1.00	4.62 ± 0.33	7.75 ± 0.30	6.92 ± 0.36	8.05 ± 0.38
2	7.10 ± 1.01	5.50 ± 1.04	5.76 ± 0.78	8.73 ± 0.16	8.18 ± 0.43	8.39 ± 0.28
3	5.68 ± 0.66	5.58 ± 0.94	3.45 ± 0.69	5.91 ± 0.13	5.46 ± 0.35	5.75 ± 0.18
4	8.09 ± 1.36	10.16 ± 2.42	8.75 ± 1.15	13.92 ± 0.35	13.26 ± 0.63	13.39 ± 0.34
AVE	6.09 ± 0.35	7.03 ± 1.14	5.85 ± 0.76	9,07 ± 0.10	8.40 ± 0.32	8.90 ± 0.16

B.NAcc	Fase Precoce			Fase Tardiva		
CpG site	Controlli	Ristretti	ABA	Controlli	Ristretti	ABA
1	5.44 ± 0.51	5.36 ± 0.12	5.50 ± 0.18	4.92 ± 0.15	5.32 ± 0.17	5.62 ± 0.17 *
2	5.72 ± 0.46	5.35 ± 0.19	5.44 ± 0.16	5.23 ± 0.07	5.27 ± 0.11	5.93 ± 0.30 *
3	4.04 ± 0.52	3.77 ± 0.23	4.22 ± 0.38	3.30 ± 0.30	3.87 ± 0.16	3.94 ± 0.15
4	9.02 ± 0.94	9.92 ± 0.69	9.51 ± 0.84	8.41 ± 0.18	8.87 ± 0.27	9.38 ± 0.45
AVE	6.06 ± 0.57	6.10 ± 0.27	6.17 ± 0.34	5.46 ± 0.12	5.83 ± 0.13	6.19 ± 0.24 *

Tabella 4. Metilazione della regione promotrice del gene *Cnr1* nell'Hyp (A) e nel NAcc (B) nella fase precoce e tardiva del protocollo ABA.

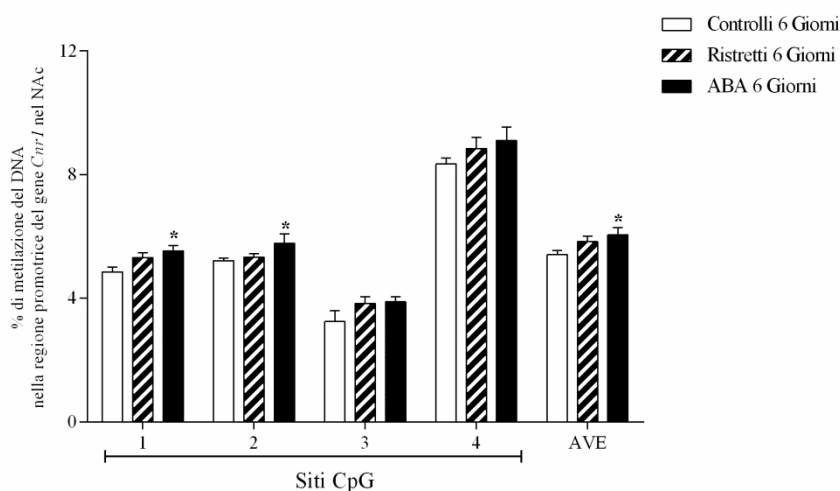


Figura 24. Percentuali di metilazione del DNA della regione promotrice del gene *Cnr1* al termine della fase tardiva del protocollo ABA. Le colonne rappresentano la media della percentuale dei valori di metilazione nei singoli siti CpG, le ultime colonne rappresentano la media (Average, AVE) dei 4 siti CpG. I dati sono espressi come media ± SEM ($n=5-7$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni * $p < 0.05$ ABA vs Controlli.

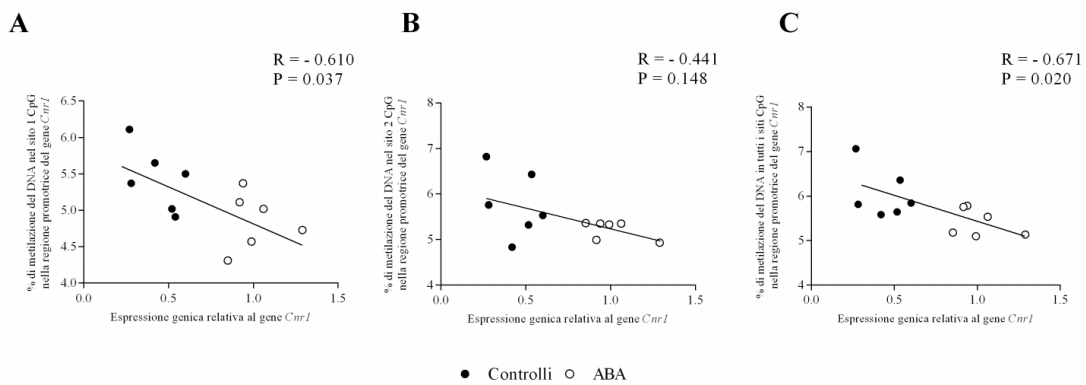


Figura 25. Correlazione tra l'espressione del gene *Cnr1* e la variazione di metilazione del DNA nel NAcc dei ratti *ABA* al termine della *fase tardiva* del protocollo rispettivamente **A**) nel sito 1 CpG **B**) nel sito 2 CpG e **C**) in tutti i siti CpG. I dati sono comparati mediante il coefficiente di correlazione per ranghi di Spermans. I dati sono espressi come media \pm SEM ($n=5-7$ animali per gruppo).

Per quanto riguarda i livelli proteici di CB1, il test ANOVA ha mostrato differenze significative fra i gruppi sperimentali [$F_{(2,7)}=7.941, p=0.015$]. L'analisi *post-hoc* rileva una diminuzione dei livelli della proteina CB1 nel gruppo *ABA* rispetto ai *Controlli* (Figura 26 B).

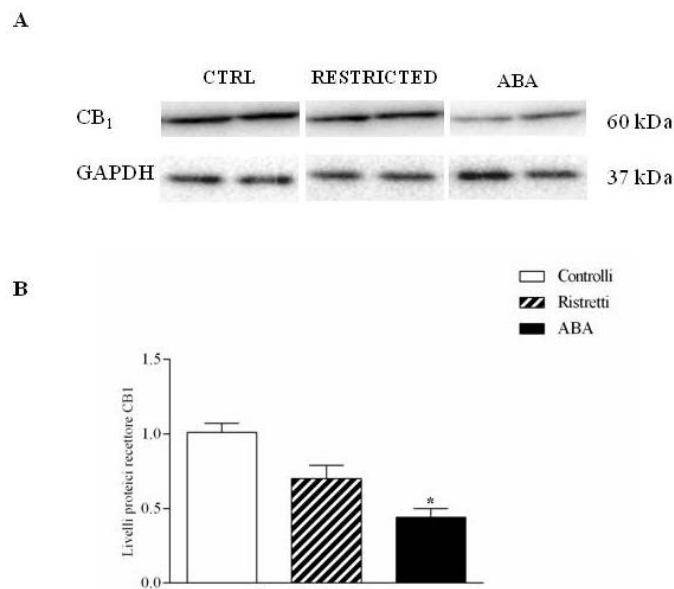


Figure 26. Analisi dei livelli proteici del recettore CB1 (60 kDa) nel NAcc, nei tre gruppi sperimentali al termine della *fase tardiva* del protocollo *ABA* (**B**). La densità ottica è stata normalizzata verso la proteina GAPDH (37 kDa) (**A**). I dati sono espressi come media \pm SEM ($n=5-7$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni * $p < 0.05$ *ABA* vs *Controlli*.

3.2 Esperimento 2: livelli DA, DOPAC e HVA e densità dei recettori D2

3.2.1 Dati comportamentali: induzione e recovery del protocollo activity-based anorexia

Nella figura 27 sono rappresentati il peso corporeo (A), il consumo di cibo (B) e l'attività fisica giornaliera (C) nelle due fasi di *induzione* e di *recovery* del protocollo ABA. Il peso corporeo dei ratti ABA diminuisce progressivamente durante l'induzione per poi incrementare successivamente durante la fase di *recovery* nella quale viene ripristinata un'alimentazione *ad libitum* anche per i ratti ABA. La perdita di peso nella fase di *induzione*, e il recupero poi, nella fase di *recovery*, risulta significativa [test ANOVA a due interazione gruppi x tempo $F_{(13,195)} = 50.40$, $p < 0.0001$]. L'assunzione di cibo nei ratti ABA durante l'*induzione* è ridotta per poi aumentare durante i giorni di *recovery* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(13,195)} = 84.63$, $p < 0.0001$]. Gli RWA giornalieri aumentano in modo significativo rispetto ai valori dell'attività basale nei giorni dell'*induzione* [ANOVA ad una via $F_{(15,90)} = 7,007$, $p < 0.0001$] per poi ridursi drasticamente durante la fase di *recovery* [ANOVA ad una via $F_{(7,56)} = 4,644$, $p = 0.0004$].

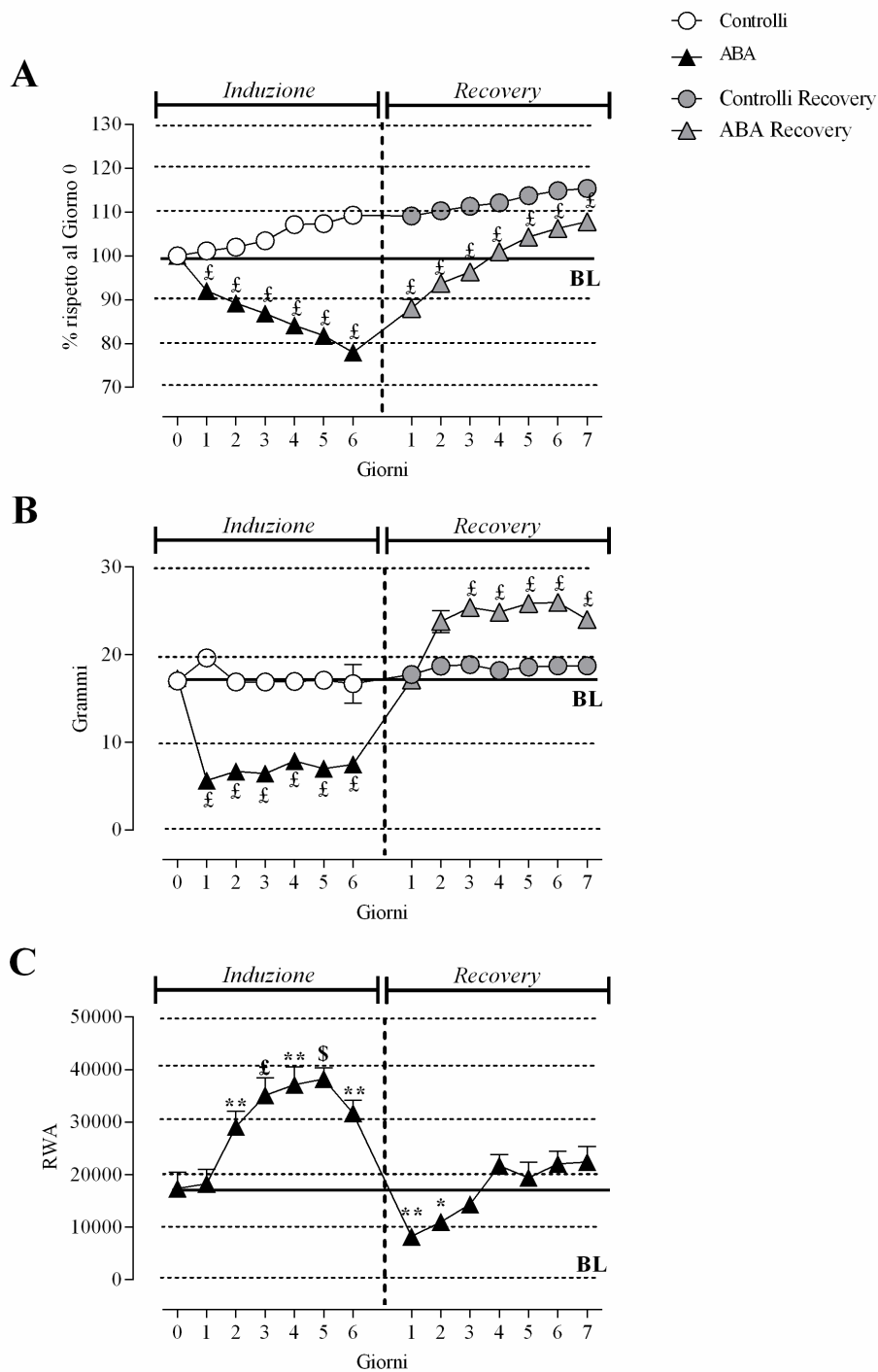


Figura 27. Rappresentazione del **A)** peso corporeo espresso in percentuale rispetto al giorno 0; **B)** consumo di cibo e **C)** attività fisica giornaliera espressa come RWA nella fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come media \pm SEM ($n=16$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: **A)** \$ $p < 0.0001$ Controlli vs ABA Giorni 1-6 e Giorni 1-7; **B)** \$ $p < 0.0001$ Controlli vs ABA Giorni 1-6 e Giorni 2-7; **C)** ** $p < 0.01$ Giorno 2,4,6 di *induzione* vs BL; £ $p < 0.001$ Giorno 5 di *induzione* vs BL; \$ $p < 0.0001$ Giorno 5 di *induzione* vs BL; * $p < 0.05$ Giorno 2 di *recovery* vs BL; ** $p < 0.05$ Giorno 1 di *recovery* vs BL.

3.2.2 Livelli cerebrali di DA, DOPAC ed HVA nella PFC, Cpu, nel NAcc e nell'Hyp al termine della fase di induzione e recovery del protocollo activity-based anorexia

Nella PFC, i cui grafici sono raffigurati nella figura 28, i livelli di DA aumentano nel gruppo *ABA* al termine dell'*induzione* rispetto ai *Controlli* [ANOVA a una via $F_{(3,28)} = 3.699, p=0.0232$; unpaired t-test di Student $t(14)=2.513 p=0.0248$]. L'aumento di DA nel gruppo *ABA* rimane statisticamente significativo anche rispetto al gruppo *ABA Recovery* [unpaired t-test di Student $t(14)=2.603 p=0.0209$]. Per quanto riguarda i due metaboliti DOPAC ed HVA il test statistico ANOVA a due vie non rileva differenze statisticamente significative nell'interazione gruppi x tempo [DOPAC: $F_{(1,28)}=1.748, p=0.1968$; HVA $F_{(1,28)}=0.03812, p=0.8466$].

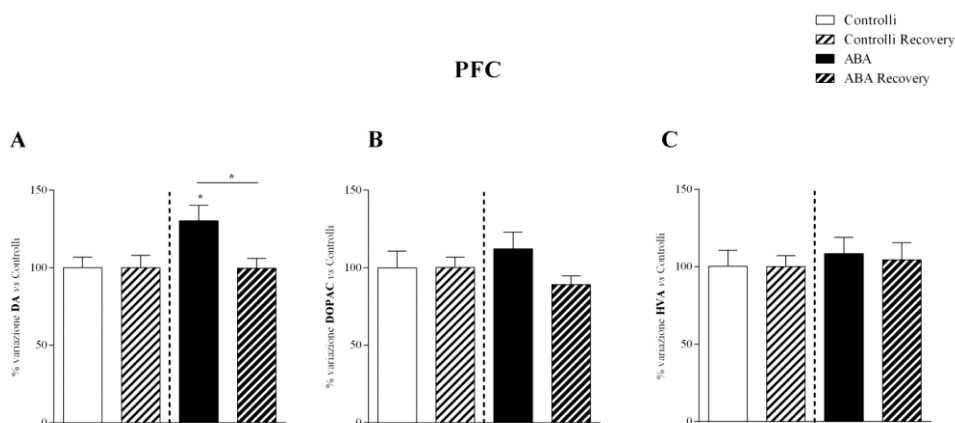


Figura 28. Livelli di DA (A), DOPAC (B) e HVA (C) nella PFC al termine della fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=8$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni o mediante l'unpaired t-test di Student: * $p<0.05$ *Controlli vs ABA*; *ABA vs ABA Recovery*.

Nella figura 29 sono rappresentati i livelli di DA e dei suoi due metaboliti DOPAC ed HVA nella CPU dei gruppi *Controlli* e *ABA*. Come possiamo notare (figura 28 A), i livelli di DA non subiscono variazioni [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=0.02732, p=0.8699$]. Al contrario, troviamo una differenza importante nei livelli di DOPAC [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=4.254, p=0.0485$]. In particolare, al termine della *recovery*, nel gruppo *ABA Recovery* si osserva una diminuzione significativa dei livelli di DOPAC rispetto sia al gruppo di controllo [unpaired t-test di Student $t(14)=2.290 p=0.0380$] ma anche rispetto al gruppo *ABA* al termine dell'*induzione* [unpaired t-test di Student $t(14) = 4.409 p = 0.0006$]. Per

quanto riguarda i livelli di HVA non si evidenziamo differenze fra i gruppi [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=1.357, p=0.2538$].

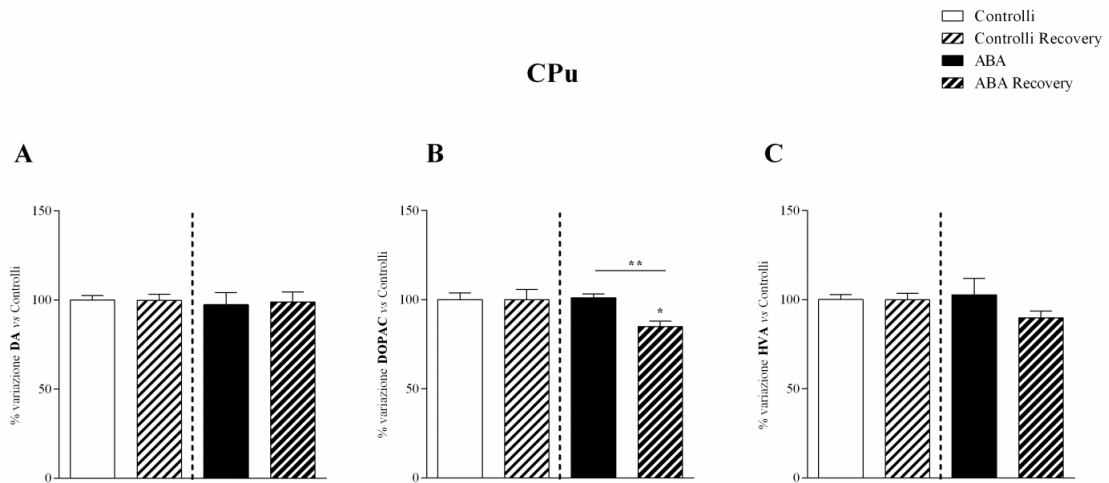


Figura 29. Livelli di DA (A), DOPAC (B) e HVA (C) nella CPu al termine della fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=8$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni o mediante l'unpaired t-test di Student: * $p<0.05$ *Controlli Recovery vs ABA Recovery* e ** $p<0.001$ *ABA vs ABA Recovery*.

Nella figura 30 vengono raffigurati i livelli dei neurotrasmettitori in un'altra area analizzata, il NAcc. Per quanto riguarda il primo grafico (figura 30 A), osserviamo una differenza nei livelli di DA [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=25.52, p<0.0001$]. Come si può osservare, i livelli di DA aumentano in maniera marcata nel gruppo *ABA* al termine dell'*induzione* rispetto al gruppo di controllo [unpaired t-test di Student $t(14)=4.329 p=0.0007$], ma anche rispetto allo stesso gruppo *ABA Recovery* [unpaired t-test di Student $t(14)=2.691 p=0.0176$]. In quest'ultimo gruppo i livelli di DA risultano aumentati rispetto al gruppo di controllo [unpaired t-test di Student $t(14)=2.718 p=0.0167$] ma rimangono inferiori al termine della fase di *ristorazione* se comparati al gruppo *ABA* al termine della fase di *induzione*. Per quanto riguarda il metabolita dopaminergico DOPAC, si osserva una variazione significativa fra i gruppi sperimentali [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=14.68, p=0.0007$]. In particolare il DOPAC diminuisce sia al termine dell'*induzione* sia al termine della *recovery* in entrambi i gruppi *ABA* [$t(14)=2.458 p=0.0276$ *Controlli vs ABA*; $t(14)=3.078 p=0.0082$ *Controlli Recovery vs ABA Recovery*]. Il metabolita HVA non subisce variazioni in nessuno dei gruppi sperimentali al termine delle due fasi del

protocollo ABA [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=0.2218$ $p=0.6414$].

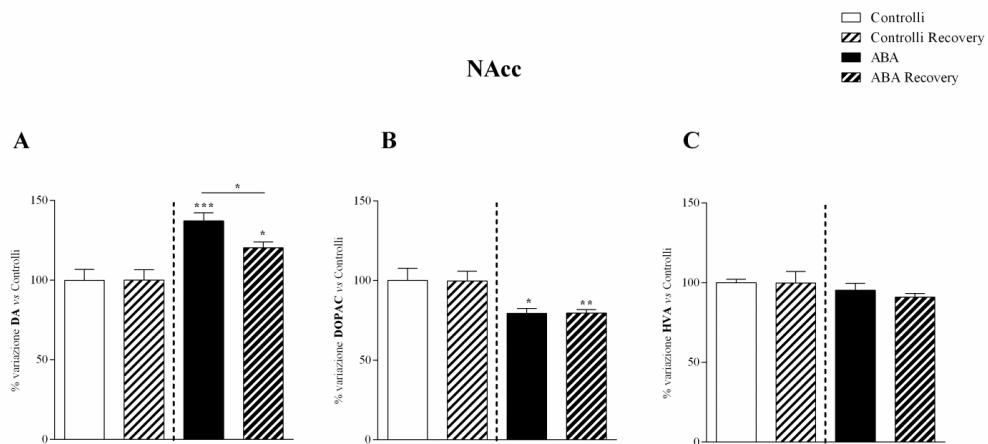


Figura 30. Livelli di DA (A), DOPAC (B) e HVA (C) nel NAcc al termine della fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=8$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni o mediante l'unpaired t-test di Student: * $p<0.05$ Controlli Recovery vs ABA Recovery, ABA vs ABA Recovery; ** $p<0.01$ Controlli Recovery vs ABA Recovery; *** $p<0.001$ Controlli vs ABA.

Nell'Hyp (figura 31) i livelli di DA non subiscono variazioni significative [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=0.02417$, $p=0.8776$] e anche i livelli di DOPAC non subiscono modificazioni, una leggera diminuzione si può osservare in entrambi i gruppi ABA al termine dell'*induzione* e della *recovery* anche se questo non è statisticamente significativo [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=0.07775$, $p=0.7824$].

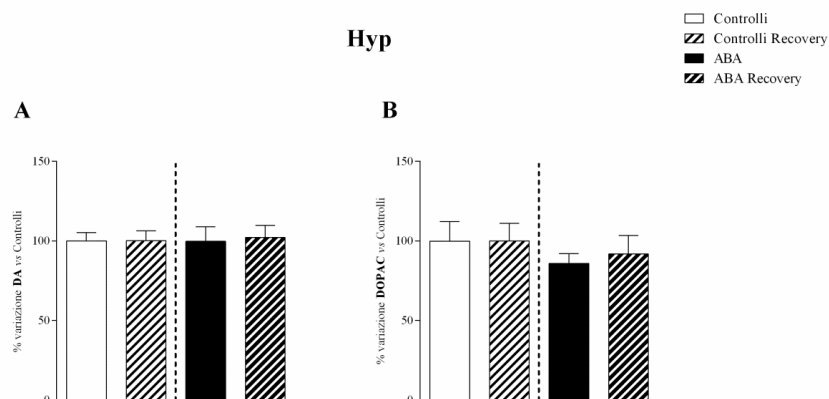


Figura 31. Livelli di DA (A) e DOPAC (B), nell'Hyp al termine della fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=8$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni o mediante l'Unpaired t-test di Student.

3.2.3 Densità dei recettori D2 nella CPu e nel Nacc al termine della fase di induzione e recovery del protocollo activity-based anorexia

La densità dei recettori D2 nella CPU, raffigurata nella figura 32, non risulta alterata nei diversi gruppi studiati rispetto alle due diverse fasi sperimentali [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=0.1577$, $p=0.6973$]. Il test statistico unpaired t-test di student fa emergere tuttavia una differenza, in particolar modo la densità dei recettori D2 risulta incrementata nel gruppo ABA rispetto ai Controlli, e rispetto al gruppo ABA Recovery [rispettivamente: $t(7)=2.502$ $p=0.0409$; $t(10)=5.156$ $p=0.0004$].

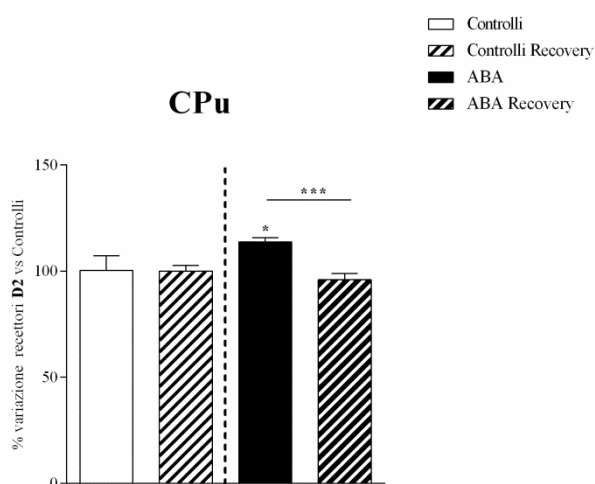


Figura 32. Densità dei recettori D2 nella CPu al termine della fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=3$ animali gruppo *Controlli*, $n=3$ animali gruppo *Recovery*, $n=6$ animali gruppo *ABA*, $n=6$ animali gruppo *ABA Recovery*). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni o mediante l'Unpaired t-test di Student: * $p<0.05$ *Controlli* vs *ABA*; *** $p<0.001$ *ABA* vs *ABA Recovery*.

Nella figura 33 troviamo rappresentati in grafico la densità dei recettori D2 nel NAcc, precisamente nel Core e nello Shell. A livello del Core possiamo osservare che non ci sono variazioni nella densità di questo recettore, si denota una leggera diminuzione nel gruppo ABA al termine dell'*induzione* che non risulta statisticamente significativa [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=2667$, $p=0.6136$]. Nella Shell, invece, emerge una differenza importante fra tutti i gruppi sperimentali [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,28)}=0.7884$, $p=0.0140$; gruppi $_{(1,28)}=9.827$, $p=0.0073$]. Come si può infatti notare nel grafico della figura 33 B la

densità dei recettori D2 aumenta significativamente nel gruppo *ABA* al termine dell'*induzione* sia rispetto ai *Controlli* sia rispetto agli *ABA Recovery* [unpaired t-test di Student $t(7)=4.286$ $p=0.0036$; $t(10)=4.500$ $p=0.0011$].

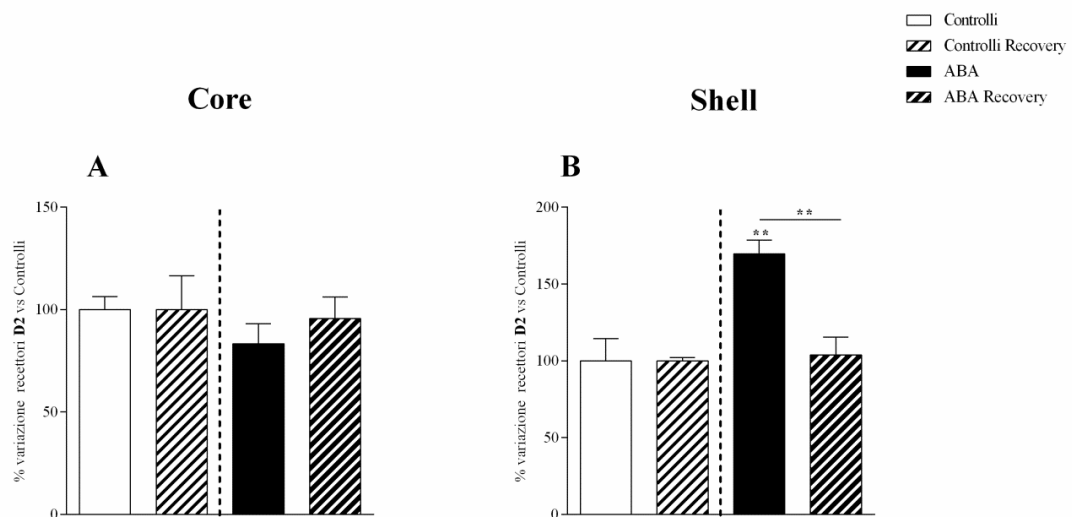


Figura 33. Densità dei recettori D2 nel NAcc Core (A) e Shell (B) al termine della fase di *induzione* e di *recovery*. Tutti i valori sono espressi come Media \pm SEM ($n=3$ animali gruppo *Controlli*, $n=3$ animali gruppo *Recovery*, $n=6$ animali gruppo *ABA*, $n=6$ animali gruppo *ABA recovery*). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni o mediante l'unpaired t-test di Student: ** $p < 0.01$ *Controlli vs ABA* e *ABA vs ABA Recovery*.

3.2.4 Esperimento 3: fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia e analisi delle componenti lipidiche plasmatiche negli animali

Fase acuta del protocollo activity-based anorexia

Peso corporeo

Come descritto e dimostrato nel nostro laboratorio (Scherma *et al.*, 2017) la restrizione alimentare combinata con l'esercizio fisico effettuato mediante la ruota, causa nelle ratte ABA una perdita di peso che può arrivare fino al 20-25 % del loro peso basale riferito al giorno 0, ovvero l'ultimo giorno della fase di *Adattamento*. Nella figura 34 è rappresentato l'andamento del peso corporeo espresso in grammi: la crescita nel caso dei ratti di controllo e la perdita di peso e poi il recupero, durante le fasi di *recovery* per le ratte ABA. L'analisi statistica effettuata mediante test statistico ANOVA a due vie ha evidenziato una significatività nell'interazione gruppi x tempo per tutte e tre le fasi acute di *induzione*: **1st aABA** [$F_{(6,132)}=141.0, p<0.0001$]; **2nd aABA** [$F_{(6,132)}=257.9, p<0.0001$]; **3rd aABA** [$F_{(6,132)}=163.2, p<0.0001$].

Durante le *recovery* gli animali ABA recuperano il peso corporeo e solo al termine della fase **3rdR-aABA** raggiungono il peso dei *Controlli*. Il peso corporeo dei *Controlli* cresce progressivamente per tutta la durata dell'esperimento. L'analisi statistica effettuata mediante test statistico ANOVA a due vie ha evidenziato una significatività nell'interazione gruppi x tempo: **1st R-aABA** [$F_{(10,220)}=36.43, p<0.0001$]; **2nd R-aABA** [$F_{(10,220)}=16.98, p<0.0001$]; **3rd aABA** [$F_{(10,220)}=11.92, p<0.0001$].

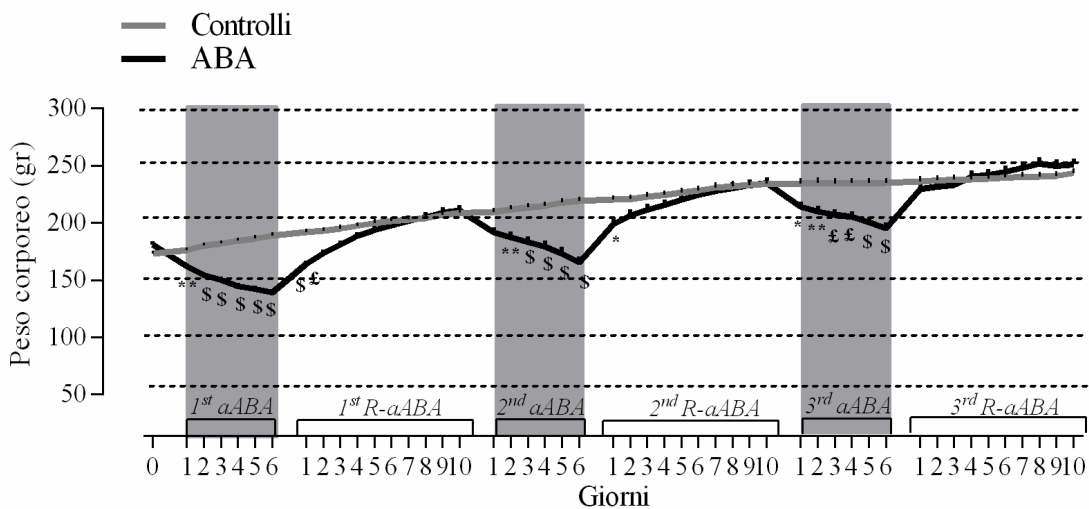


Figura 34. Peso corporeo nel gruppo *Controlli* e ABA durante le tre fasi acute (*aABA*) e di *recovery* (*R-aABA*). I risultati sono rappresentati come media \pm SEM ($n=12$ animali per gruppo)

sperimentale). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, £ $p < 0.001$, \$ $p < 0.0001$ *Controlli vs ABA*.

Consumo di cibo

Gli animali *ABA* subiscono una restrizione alimentare temporale ma non quantitativa, di 90 minuti al giorno, al contrario dei ratti *Controlli* che ricevono cibo *ad libitum*. Come si può osservare nel grafico riportato nella figura 35, durante le fasi di *induzione* i ratti *ABA* assumono una quantità di calorie minore rispetto ai *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo **1st aABA** $F_{(6,132)}=36.03$, $p < 0.0001$; **2nd aABA** $F_{(6,132)}=43.49$, $p < 0.0001$; **3rd aABA** $F_{(6,132)}=43.49$, $p < 0.0001$]. Al contrario, durante le fasi di *recovery* i ratti *ABA* hanno ricevuto il cibo per 24 ore al giorno, consentendo loro di ripristinare il peso corporeo, e assumere una quantità di cibo superiore ai ratti di controllo [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo **1st R-aABA** $F_{(10,220)}=36.03$, $p < 0.0001$; **2nd R-aABA** $F_{(10,220)}=43.49$, $p < 0.0001$; **3rd R-aABA** $F_{(10,220)}=43.49$, $p < 0.0001$].

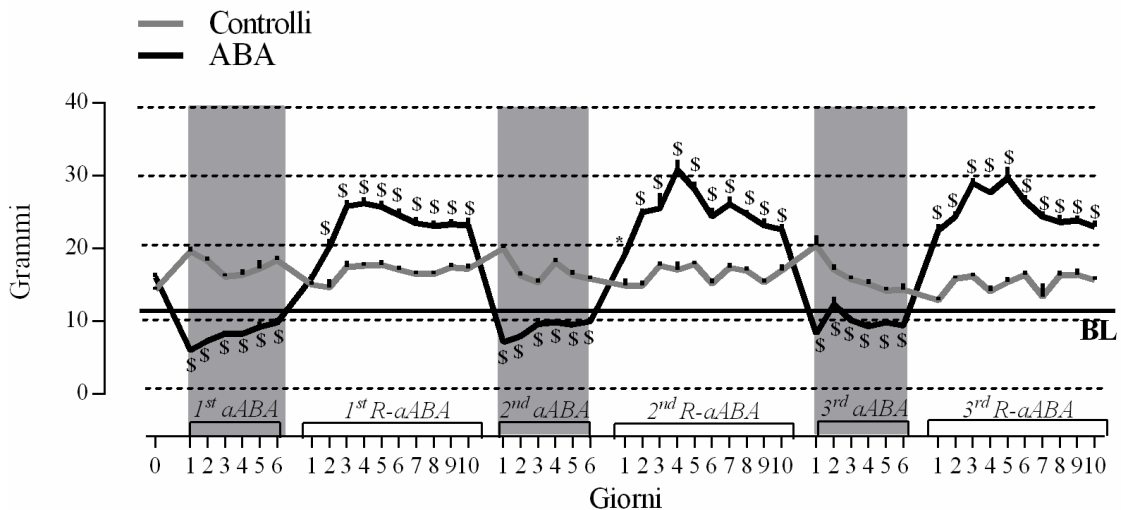


Figura 35. Consumo di cibo nelle 24 ore, nel gruppo *Controlli* e *ABA* durante le tre fasi acute (*aABA*) e di *recovery* (*R-aABA*). I risultati sono rappresentati come media \pm SEM (n=12 animali per gruppo sperimentale). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, £ $p < 0.001$, \$ $p < 0.0001$ *Controlli vs ABA*.

Attività fisica

L'attività fisica delle ratte *ABA*, rappresentata graficamente nella figura 36, aumenta progressivamente durante le fasi di *induzione* e risulta più elevata rispetto all'attività basale della fase di *Adattamento* (BL). Durante i primi giorni delle fasi di *recovery* tende a diminuire per poi incrementare nuovamente. L'analisi statistica mediante test ANOVA ad una via rileva, durante le fasi acute di *induzione*, un importante e statisticamente significativo aumento dell'attività fisica quando comparata al giorno 0: **1st aABA** [$F_{(6,77)}=3.8, p=0.0023$]; **2nd aABA** [$F_{(6,77)}=5.28, p=0.0001$]; **3rd aABA** [$F_{(6,77)}=5.28, p=0.0001$]. Durante le fasi di *recovery*, lo stesso test statistico mette in evidenza che nella **1st R-aABA** l'attività fisica è nettamente superiore rispetto all'attività basale (BL) [$F_{(10,121)}=4.476, p<0.0001$], così come nella **2nd R-aABA** [$F_{(10,121)}=3.618, p=0.0003$] ed infine la differenza statistica si mantiene anche nella **3rd R-aABA** [$F_{(4,181,45,99)}=6.029, p=0.0005$].

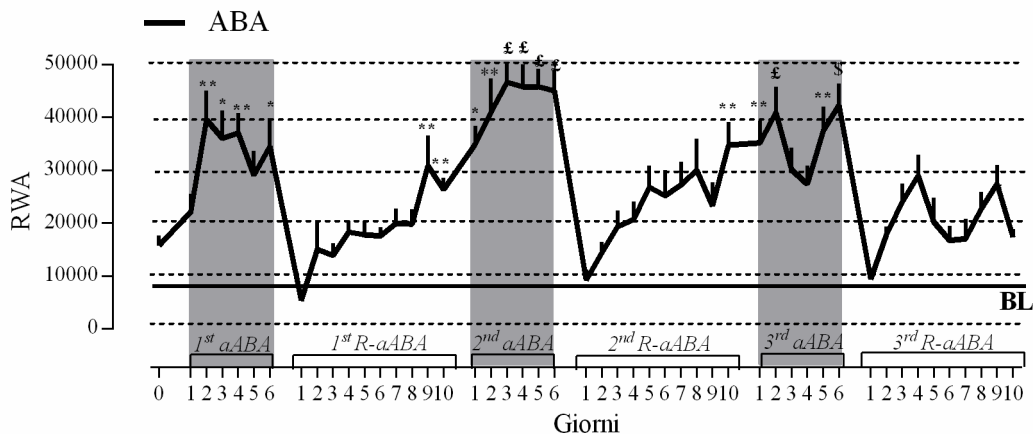


Figura 36. Attività fisica giornaliera espressa come RWA nel gruppo *ABA* durante le tre fasi di *induzione* (*aABA*) e *recovery* (*R-aABA*). I risultati sono rappresentati come media \pm SEM ($n=12$ animali per gruppo). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, £ $p<0.001$, \$ $p<0.0001$ *ABA* vs *Giorno* 0).

3.2.5 Fase cronica del protocollo activity-based anorexia

Alla fine della fase acuta, l'ultimo giorno della 3rd R-aABA, gli animali sono stati esposti alla fase di *induzione* cronica del protocollo sperimentale. Le condizioni rimangono le medesime della fase acuta, l'unica differenza è che gli animali per accedere alle fasi di *recovery* devono aver una dimostrata perdita di peso del 20-25 % riferito al loro peso basale, ovvero il peso raggiunto l'ultimo giorno della fase precedente di *recovery*. La media dei giorni richiesti per raggiungere questa percentuale di perdita di peso, per quanto riguarda la fase 1st cABA, è stata di circa 18 giorni. Ogni animale ha impiegato un periodo di tempo differente per ottenere la perdita di peso necessaria per accedere alla fase successiva del protocollo. Pertanto il numero di animali analizzati statisticamente varia a seconda dei giorni del protocollo sperimentale. Per quanto riguarda i giorni **1-3-6-9** della fase di *induzione* 1st cABA abbiamo un numero di 12 animali per gruppo sperimentale; per il giorno **12** $n=10$ animali per gruppo sperimentale; per il giorno **15** di $n=7$ animali per gruppo sperimentale e infine per il giorno **18** un numero di animali pari a 5 per gruppo sperimentale. Per quanto riguarda la fase di *recovery*, 1st R-aABA, il numero di animali è di $n=12$ per gruppo sperimentale. Per quanto riguarda la 2nd cABA abbiamo invece per i giorni **1-3-6-9** $n = 12$ animali per gruppo sperimentale, per il giorno **12** $n=11$ animali ed infine per il giorno 15 $n=8$ per gruppo sperimentale. Per quanto riguarda la 2nd R-cABA abbiamo $n=6$ animali per gruppo sperimentale.

3.2.6 Peso corporeo nella 1st c-ABA e 1st R-cABA e nella 2nd c-ABA e 2nd R-cABA

Nella prima fase cronica di *induzione*, la 1st c-ABA, rappresentata nel grafico in figura 37, negli animali ABA assistiamo ad una progressiva e costante perdita di peso corporeo rispetto al gruppo dei *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(6,126)}=5.668, p<0.0001$].

Durante la *recovery* i ratti ABA recuperano il loro peso corporeo grazie al regime di alimentazione *ad libitum* e al giorno 9 dimostrano un aumento leggermente superiore anche al peso dei *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo: $F_{(4,88)}=34.23, p<0.0001$].

Al termine della fase 1^{st} R-cABA gli animali sono stati sottoposti ad una seconda fase cronica di *induzione* del protocollo ABA, come si evince dal grafico sempre in figura 37. La media dei giorni richiesti è stata di 15 giorni. Anche in questo caso, come possiamo osservare dal grafico in figura 37, la perdita di peso è progressiva diventando marcata gli ultimi giorni della fase cronica, se paragonata al gruppo *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(5,122)}=3.974$, $p=0.0023$]. Una volta dimostrata una perdita di peso del 20-25 % gli animali avevano accesso alla fase di *recovery*, l'ultima per quanto riguarda la fase cronica del protocollo ABA. Durante la fase di *recovery* (2^{nd} R-cABA), il test ANOVA a due vie ha messo in evidenza un progressivo recupero del peso corporeo dei ratti ABA se confrontati con i ratti *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(4,40)}=12.08$, $p<0.0001$].

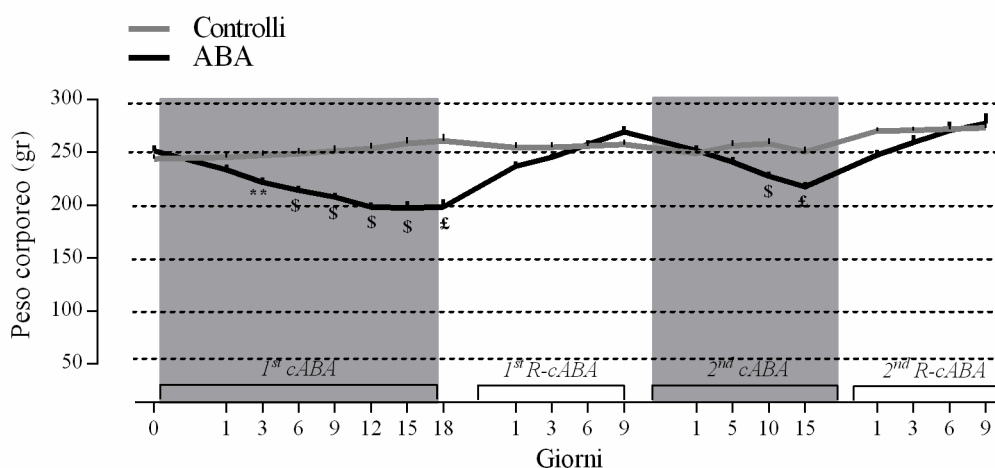


Figura 37. Peso corporeo dei ratti *Controlli* e ABA durante le due fasi croniche (cABA) e di *recovery* (R-cABA). I risultati sono rappresentati come media \pm SEM (animali per gruppo sperimentale da $n=12$ a $n=6$). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e l'unpaired t-test di Student: ** $p<0.01$, £ $p<0.001$, \$ $p<0.0001$ (*Controlli* vs ABA).

3.2.7 Consumo di cibo nella 1^{st} c-ABA e 1^{st} R-cABA e nella 2^{nd} c-ABA e 2^{nd} R-cABA

Come per le fasi di *induzione* acute, anche in quelle croniche, i ratti ABA sono sottoposti ad un regime di restrizione alimentare. Il gruppo dei *Controlli* invece ha libero accesso al cibo. Durante le fasi di *induzione* croniche pertanto, le calorie assunte dal gruppo ABA saranno inferiori rispetto ai *Controlli*, come mostra il grafico in figura 28 [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(6,126)}=4.912$, $p=0.0002$].

Per quanto riguarda la fase di *recovery* (1^{st} *R-cABA*) abbiamo anche in questo caso un aumento significativo dell'assunzione di cibo da parte dei ratti *ABA* rispetto ai *Controlli* [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo, $F_{(4,88)}=12.94$, $p<0.0001$].

Dopo la 2^{nd} *cABA* le ratte *ABA* vengono esposte nuovamente ad una fase cronica di *induzione* ed anche in questo caso l'assunzione di cibo, risulta essere minore rispetto ai *Controlli* anche se non statisticamente significativo [ANOVA a due vie, interazione gruppi x tempo $F_{(5,120)}=2.286$, $p=0.0503$]. In questo caso emerge una differenza statisticamente significativa solo fra i gruppi *ABA* e *Controlli* [ANOVA a due vie, interazione fra i gruppi $F_{(1,120)}=40.51$, $p<0.0001$]. Come si osserva nel grafico della figura 37 durante la 2^{nd} *R-cABA* gli animali *ABA* recuperano un maggiore peso corporeo grazie anche all'aumento più marcato dell'assunzione di cibo. L'analisi statistica conferma questa differenza [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(4,40)}=7.001$, $p<0.0002$].

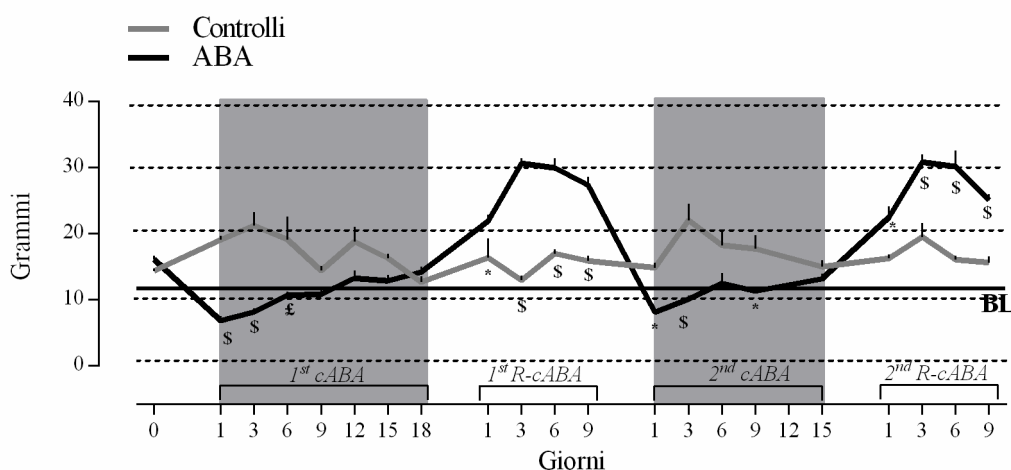


Figura 38. Consumo di cibo nelle 24 ore, nel gruppo *Controlli* e *ABA* durante le due fasi croniche (*cABA*) e di *recovery* (*R-cABA*). I risultati sono rappresentati come media \pm SEM (animali per gruppo sperimentale da $n=12$ a $n=6$). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e l'unpaired t-test di Student: * $p<0.05$, £ $p<0.001$, \$ $p<0.0001$ *Controlli vs ABA*.

3.2.8 Attività fisica nella 1st c-ABA e 1st R-cABA e nella 2nd c-ABA e 2nd R-cABA

Durante la 1st cABA, come si denota dalla figura 38 in cui sono mostrati gli RWA giornalieri, gli animali ABA aumentano progressivamente l'attività fisica, per ridursi leggermente l'ultimo giorno della prima fase cronica di *induzione*. Questa iperattività è statisticamente maggiore rispetto ai livelli basali riferiti al giorno 0 [ANOVA a una via $F_{(7,74)}=3.283$, $p=0.0043$]. Per quanto riguarda la fase di *recovery* (1st R-cABA) il test ANOVA ad una via rileva una diminuzione dell'attività fisica che poi tende negli ultimi giorni ad aumentare raggiungendo nuovamente i livelli basali [$F_{(4,55)}=2.205$, $p=0.0804$]. Durante la 2nd cABA l'attività fisica tende a diminuire rispetto alla 1st cABA ma rimane superiore alla BL [ANOVA ad una via $F_{(6,72)}=2.629$, $p=0.0232$]. Durante la fase 2nd R-cABA l'attività fisica diminuisce drasticamente, assumendo valori al di sotto di quelli basali [test ANOVA ad una via, $F_{(4,25)}=0.5976$, $p = 0.6677$].

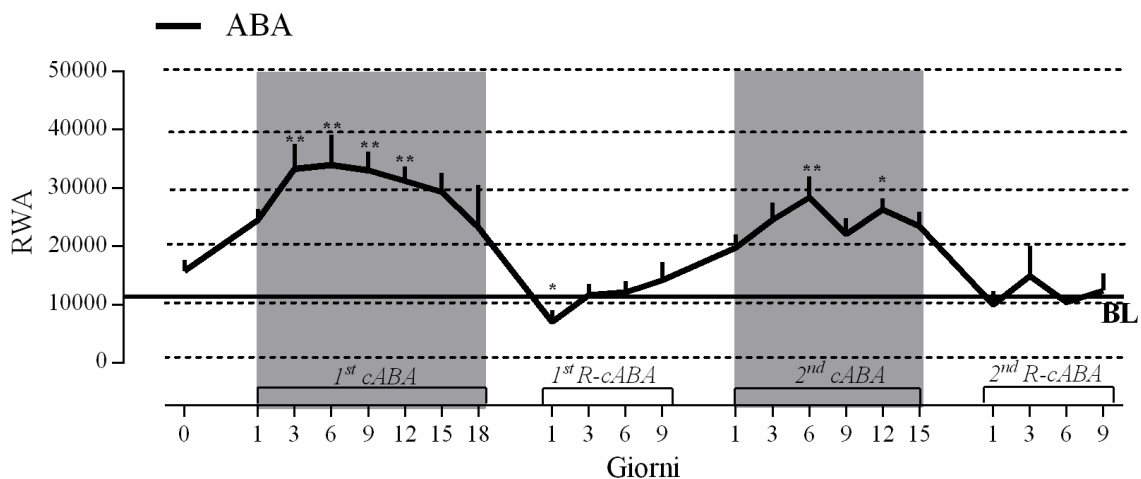


Figura 38. Attività fisica giornaliera espressa come RWA nel gruppo ABA durante le due fasi croniche (cABA) e di *recovery* (R-cABA). I risultati sono rappresentati come media \pm SEM (animali per gruppo sperimentale da $n=12$ a $n=6$). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e l'unpaired t-test di Student: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ABA vs Giorno 0.

3.2.9 *Differente rappresentazione di analisi del peso corporeo negli animali ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia*

Nel grafico presente nella figura 39 è rappresentata la perdita ed il recupero del peso corporeo da parte delle ratte *ABA* durante le fasi acuta e cronica del protocollo *ABA*. Questo grafico riassuntivo è stato realizzato per poter confrontare le due fasi acute e croniche e per poter valutare l'andamento della perdita e del successivo recupero del peso corporeo.

Analizzando la fase acuta del protocollo possiamo notare che la perdita di peso corporeo risulta omogenea nelle tre fasi di *induzione*, con un lieve aumento nel dimagrimento relativo alla seconda *induzione* acuta: **1st aABA** (-41.67 g ± 2.843); **2nd aABA** (-45.50 g ± 2.439); **3rd aABA** (-39.33 g ± 1.453), [ANOVA ad una via $F_{(2,33)}=1.802, p=0.1808$].

Comparando invece la **2nd aABA** e la **3rd aABA** mediante il test statistico unpaired t-test di Student emerge una differenza tra le due fasi acute di *induzione* [$t(22)=2.172, p=0.0409$].

Per quanto riguarda i periodi di *recovery* i ratti *ABA* hanno recuperato la maggiore quantità di peso corporeo nel **1st R-aABA** (+ 71.33 g ± 3.495) rispetto al **2nd R-aABA** (67.89 ± 3.958) ed alla **3rd R-aABA** (57.50 g ± 3.397) [ANOVA ad una via: $F_{(2,33)}=3.937, p=0.0293$]. In particolare questa differenza si fa più significativa fra la **1st R-aABA** e la **3rd R-aABA** [unpaired t-test di Student $t(22)=2.838, p=0.0096$]. Come si può notare, nella terza fase di recupero, il peso corporeo riacquisito dalle ratte *ABA* è inferiore rispetto alle altre due fasi acute. Nella corrispettiva fase acuta infatti, la **3rd R-aABA**, le ratte *ABA* avevano perso una quantità di peso inferiore rispetto alle altre due fasi.

Esaminando la fase cronica, sempre nel grafico della figura 39, l'analisi statistica non ha mostrato differenze nella quantità di peso corporeo perso per quanto riguarda i due stadi di restrizione [unpaired t-test di Student $t(22)=1.265, p=0.2190$ **1st cABA** vs **2nd cABA**], così come tra le due fasi di *recovery* [unpaired t-test di Student $t(16)=1.567, p=0.1367$].

Confrontando le due fasi, acuto e cronico, possiamo notare come nella fase cronica ci sia un mantenimento della perdita del peso corporeo. Analizzando le sole fasi di *induzione*, il test statistico ANOVA ad una via ha denotato una differenza

statisticamente significativa fra le tre fasi acute e le due fasi croniche [$F_{(4,55)}=5.880$, $p=0.0005$]. Come si può osservare dal grafico la quantità di peso corporeo perso nella 1st cABA e nella 2nd cABA supera quello perso nelle altre tre fasi acute.

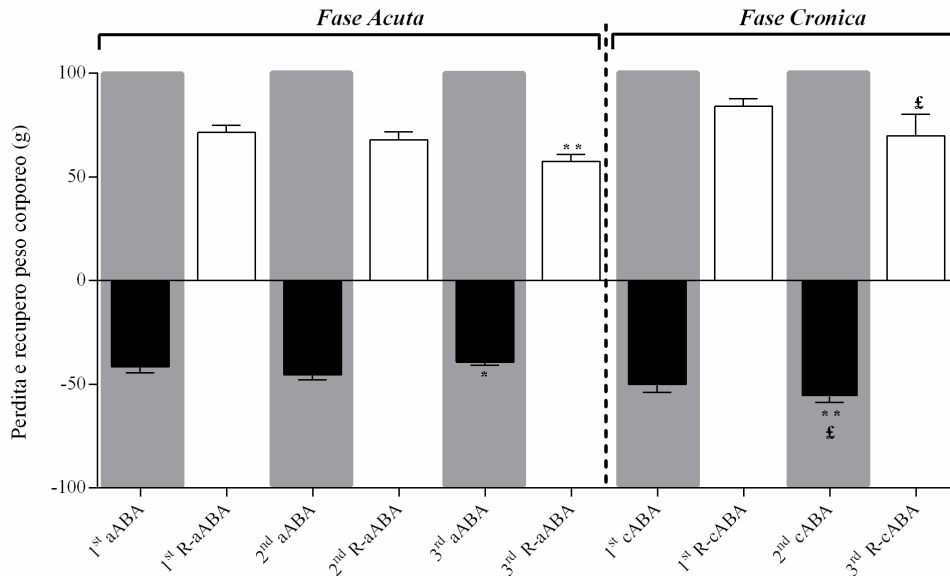


Figura 39. Perdita e recupero complessivo del peso corporeo dei ratti ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo ABA. I risultati sono rappresentati come media \pm SEM ($n=12$ animali per gruppo, per la 2nd R-cABA $n=6$ animali per gruppo). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare: le colonne nere rappresentano la perdita di peso e le colonne bianche il recupero del peso corporeo. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e l'Unpaired t-test di Student (* $p<0.05$ 2nd aABA vs 3rd aABA; ** $p<0.01$ 1st aABA vs 2nd cABA; £ $p<0.001$ 3rd aABA vs 2nd cABA e 3rd R-cABA vs 1st R-cABA).

3.2.10 Differente rappresentazione di analisi del consumo di cibo negli animali ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia

Nel grafico presente in figura 40 è rappresentata la media della quantità di cibo consumata dai ratti ABA nei vari stadi della fase acuta e cronica. Come si può vedere dal grafico nelle fasi di restrizione i ratti ABA assumano una quantità di cibo nettamente inferiore rispetto a quella delle fasi di *recovery*. Per quanto riguarda la fase acuta possiamo vedere un leggero aumento del consumo calorico nei 90 minuti di accesso al cibo giornalieri durante la 3rd aABA ($9.861 \text{ g} \pm 0.3417$) rispetto alla 1st aABA ($8.152 \text{ g} \pm 0.3722$), [ANOVA a una via $F_{(2,33)}=6.710$, $p=0.0036$].

Nello specifico, una marcata differenza nell'assunzione di cibo è presente fra la 1st aABA e la 3rd aABA [unpaired t-test di Student t(22)=3.382 p=0.0027]. Ricordiamo che proprio nella 3rd aABA si riscontrava anche una diminuzione della perdita di peso corporeo, come descritto nel paragrafo precedente.

Per quanto riguarda invece i periodi di *recovery* della fase acuta possiamo osservare anche in questo caso un aumento del consumo di cibo [ANOVA ad una via $F_{(2,33)}=7.478$, $p=0.0021$; unpaired t-test di Student t(22)=3.433 $p=0.0024$ 1st R-aABA vs 2nd R-aABA; t(22)=3.300 $p=0.0033$ R-aABA vs 3rd R-aABA].

Durante fase cronica non ci sono differenze nell'assunzione di cibo tra la 1st cABA (10.68 g ± 0.5221) e la 2nd cABA (11.26 g ± 0.3770), così come nella 1st R-cABA e nella 2nd R-cABA.

Analizzando nello specifico la quantità di cibo consumato tra la fase acuta e quella cronica è emersa una differenza statisticamente significativa. Osservando il grafico in figura 40, possiamo notare un progressivo aumento della quantità di cibo assunto dai ratti ABA durante i 90 minuti [test ANOVA a una via $F_{(4,55)}=10.30$, $p<0.0001$]. Questa differenza si fa più marcata confrontando ad esempio la 1st aABA con la 1st cABA e la 2nd cABA, in quanto nei periodi cronici l'assunzione di cibo è nettamente maggiore rispetto alle fasi acute.

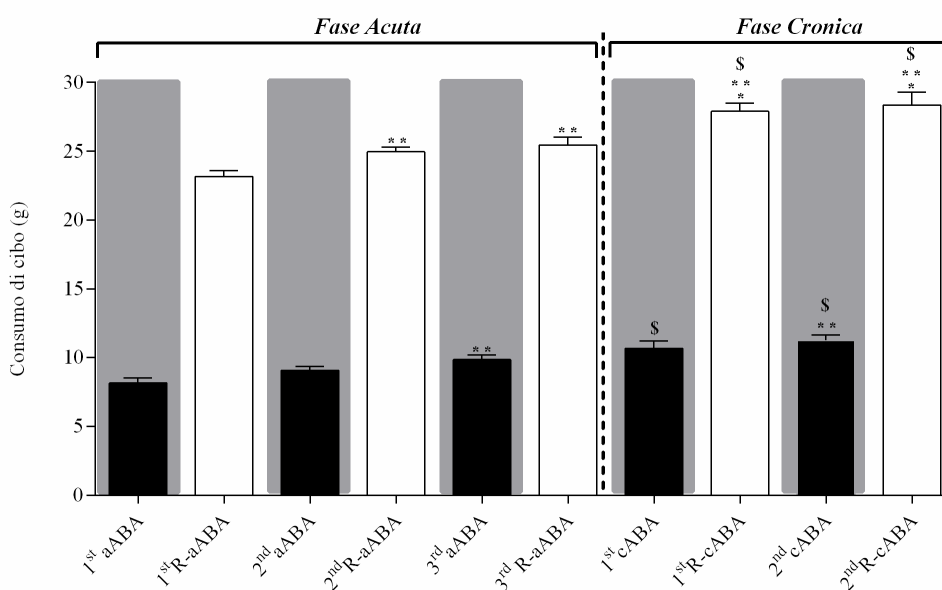


Figura 40. Quantità di cibo consumato dai ratti ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo ABA. I risultati sono rappresentati come media ± SEM ($n=12$ animali per gruppo, per la 2nd R-cABA $n=6$ animali per gruppo). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione

alimentare: le colonne nere rappresentano la quantità di cibo assunto durante i 90 minuti di libero accesso al cibo previsto dal protocollo ABA, le colonne bianche l'assunzione di cibo dei ratti ABA durante i periodi di *recovery*. L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e l'unpaired t-test di Student: * $p < 0.05$ 3rd R-aABA vs 1st R-cABA, 3rd R-aABA vs 2nd R-cABA, ** $p < 0.01$ 1st R-aABA vs 2nd R-aABA, 1st aABA vs 3rd R-aABA, 1st R-aABA vs 3rd R-aABA, 2nd R-aABA vs 1st R-cABA, 2nd R-aABA vs 2nd R-cABA; \$ $p < 0.0001$ 1st R-aABA vs 1st R-cABA, 1st R-aABA vs 2nd R-cABA.

3.2.11 *Differente rappresentazione di analisi dell'attività fisica (RWA) negli animali ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia*

Nel grafico della figura 41 è raffigurata la media dell'attività fisica effettuata dagli animali ABA in ogni stadio della fase acuta e cronica del protocollo ABA. Per quanto riguarda la fase acuta possiamo notare una tendenza, seppur non significativa, all'aumento dell'attività fisica nella 2nd aABA (RWA 34343 ± 3358) rispetto agli altri due stadi di restrizione [1st aABA RWA 26345 ± 3104 e 3rd aABA RWA 28624 ± 2877; test ANOVA ad una via: $F_{(2,33)}=1.745$, $p=0.190$]. L'attività sulla ruota durante le fasi di recupero del peso corporeo è decisamente ridotta anche se nella 2nd R-aABA (RWA 23070 ± 2609) abbiamo un leggero aumento, seppur non significativo, degli RWA rispetto agli altri due stadi (1st R-aABA RWA 18480 ± 1984 e 3rd R-aABA RWA 20144 ± 2280; test ANOVA ad una via $F_{(2,33)}=1.016$, $p=0.3731$]. Per quanto riguarda la fase cronica nei due stadi di restrizione non ci sono differenze nell'attività fisica effettuata dalle ratte ABA, si denota una leggera diminuzione nella 2nd cABA che non risulta statisticamente significativa [unpaired t-test di Student: $t(22)=1.618$ $p=0.1109$ 1st cABA vs 2nd cABA]. Anche per quanto riguarda le fasi *recovery* non ci sono differenze negli RWA effettuati globalmente [unpaired t-test di Student: $t(16)=0.6754$ $p=0.5091$ 1st R-cABA vs 2nd R-cABA].

Comparando i due stadi del protocollo, acuto e cronico, abbiamo voluto valutare se l'attività fisica dei ratti ABA avesse subito delle variazioni. L'analisi statistica mediante test ANOVA ad una via non ha rilevato differenze [$F_{(2,33)}=1.016$, $p=0.3731$].

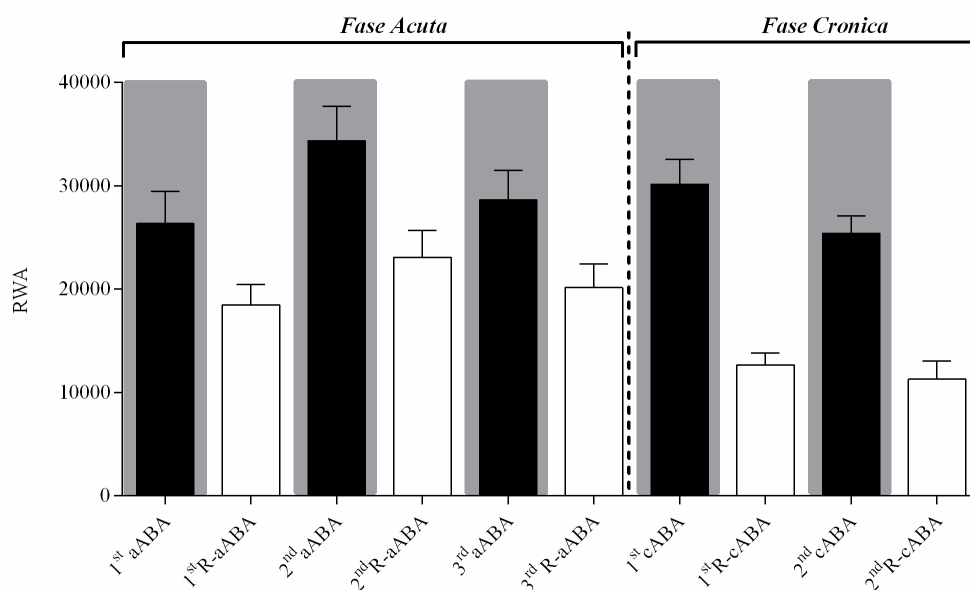


Figura 41. Attività fisica complessiva dei ratti ABA durante la fase acuta e cronica del protocollo ABA. I risultati sono rappresentati come media \pm SEM ($n=12$ animali per gruppo, per la 2nd R-cABA $n=6$ animali per gruppo). In grigio sono rappresentati i periodi di restrizione alimentare, le colonne nere raffigurano l'attività fisica dei ratti ABA durante le fasi di induzione, le colonne bianche durante le fasi di recovery.

3.2.12 Peso di fegato e VAT al termine della 2nd cABA e 2nd R-cABA

Al termine della fase 2nd cABA e R-cABA, dopo aver sacrificato gli animali sono stati prelevati il fegato ed il VAT per la valutazione del loro peso. Per quanto riguarda il peso del fegato, il test statistico ANOVA a due vie ha riscontrato una rilevante differenza statistica nell'interazione gruppi x tempo [$F(1,10)=17.46$, $p=0.0019$]. Come si può osservare nel grafico della figura 42 A, il peso del fegato nei ratti ABA al termine della 2nd cABA è notevolmente ridotto rispetto ai Controlli [unpaired t-test di Student $t(12)=4.533$ $p=0.007$]. Al termine della 2nd R-cABA i ratti ABA mostrano un recupero del peso del fegato e questo recupero è significativo rispetto al gruppo Controlli [unpaired t-test di Student $t(12)=3.758$ $p=0.0027$], ma anche rispetto al gruppo ABA [unpaired t-test di Student $t(12)=7.340$ $p<0.001$].

Sempre nella figura 42 B possiamo osservare la rappresentazione del peso del VAT espresso in grammi al termine delle due fasi, di induzione e di recovery 2nd cABA e 2nd R-cABA. Dopo il protratto periodo di restrizione alimentare il VAT delle ratte ABA è ridotto in modo importante, rispetto al gruppo di Controllo [unpaired t-test di Student

t(12)=4.839 p=0.0004] e al termine della 2nd R- cABA possiamo denotare un recupero di questo tessuto adiposo che non raggiunge però i livelli del gruppo *Controlli*. Questo recupero risulta statisticamente significativo se comparato con il peso del VAT del gruppo *ABA* al termine della 2nd cABA [unpaired t-test di Student t(12)=3.832 p=0.0024]. Il test statistico ANOVA a due vie infatti evidenzia un'interazione significativa gruppi x tempo [F_(1,10)=41.43, p<0.0001].

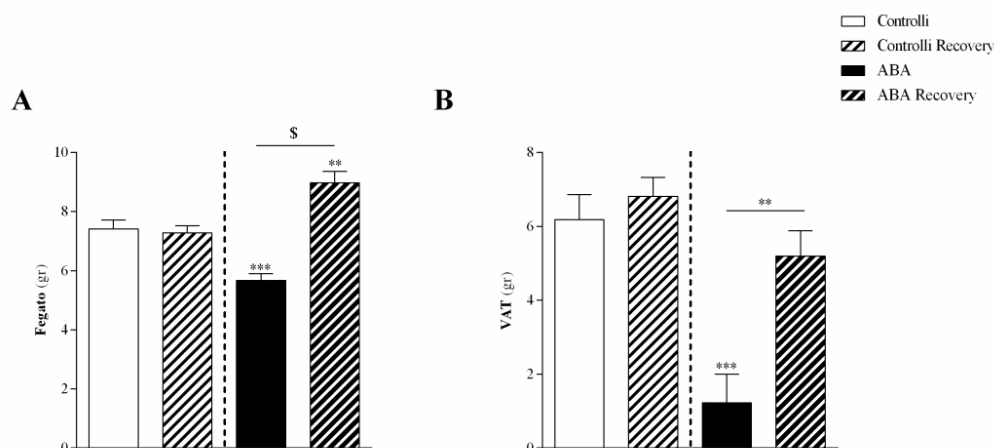


Figura 42. Rappresentazione grafica della variazione del peso del fegato (A) e del VAT (B) al termine della 2nd cABA e della 2nd R-cABA nei ratti *Controlli* e *ABA*. I dati sono espressi come media \pm SEM ($n=6$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e mediante l'unpaired t-test di Student's t: ** $p<0.01$ ABA vs ABA Recovery, *** $p<0.001$ Controlli vs ABA, \$ $p<0.0001$ ABA vs ABA Recovery.

3.2.13 Livelli plasmatici degli acidi grassi essenziali 18:3 n-3 e 18:2 n-6 al termine della 2nd cABA e 2nd R-cABA

Gli acidi grassi essenziali 18:3 n-3 e 18:2 n-6 negli animali *ABA* subiscono una netta diminuzione rispetto agli animali di controllo al termine della fase 2nd cABA. Una volta che gli animali ricevono invece cibo *ad libitum* e ripristinano la dieta, questi livelli tornano simili ai valori del gruppo *Controlli*, come si può notare al termine della 2nd R-cABA. L'analisi statistica mediante test ANOVA a due vie evidenzia questi cambiamenti nei livelli dell'acido grasso 18:3 n3 che risultano statisticamente significativi [interazione gruppi x tempo F_(1,10)=6.499, p=0.0289]. Come si evince dal grafico della figura 43 A, i livelli di acido grasso risultano notevolmente diminuiti nel gruppo *ABA* rispetto al gruppo dei *Controlli* [unpaired t-test di Student t(10)=5.371

$p=0.0003$] e questa differenza è evidente anche tra il gruppo *ABA* al termine della 2nd *cABA* e della 2nd *R-cABA* [unpaired t-test di Student $t(10)=3.087$ $p=0.0115$].

Nella figura 43 B sono riportati in grafico i livelli di acido grasso 18:2 n6 espressi sempre in nmoli di acido grasso per mg di tessuto pesato. Anche in questo caso osserviamo una differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi sperimentali nel tempo [ANOVA a due vie interazione gruppi x tempo $F_{(1,10)}=8.171$, $p=0.0170$]. Nello specifico, possiamo focalizzare la nostra attenzione sulla differenza marcata fra il gruppo *ABA* e il gruppo *Controlli*, dove nel primo troviamo un ridotto livello dell'acido grasso preso in esame [unpaired t-test di Student $t(10)=6.777$ $p<0.0001$]. Al termine della 2nd *R-cABA* i livelli di 18:2 n6, nel gruppo *ABA Recovery* ritornano simili ai valori dei *Controlli Recovery*, e questa differenza è statisticamente significativa rispetto al gruppo *ABA* [unpaired t-test di Student $t(10)=0.03222$ $p=0.9749$].

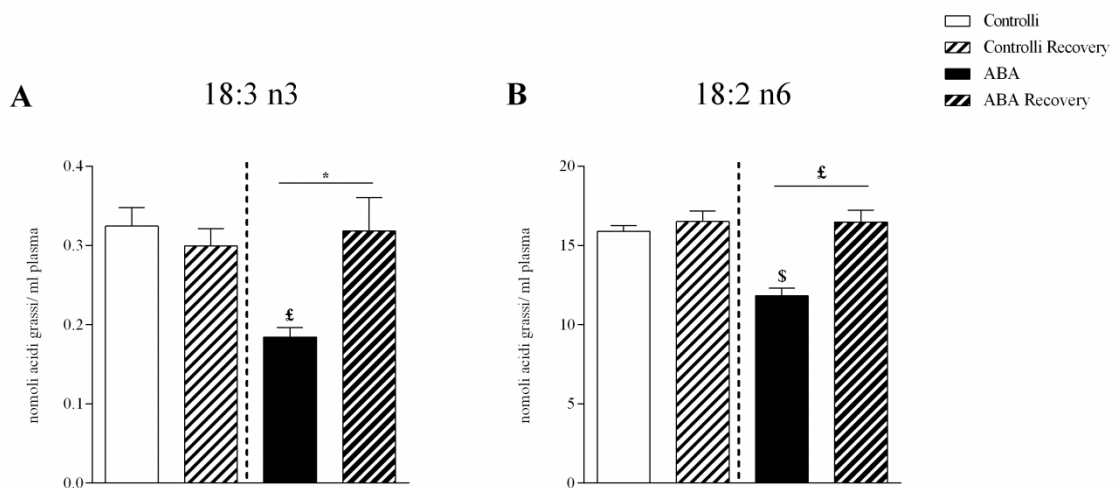


Figura 43. Livelli di acidi grassi **A)** 18:3 n-3 e **B)** 18:2 n-6 nel plasma dei ratti *Controlli* e *ABA*. I dati sono espressi come media \pm SEM ($n=6$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e unpaired t-test di Student: * $p<0.05$ *ABA* vs *ABA Recovery*; £ $p<0.001$ *Controlli* vs *ABA* e *ABA* vs *ABA Recovery*; \$ $p<0.0001$ *Controlli* vs *ABA*.

3.2.14 Livelli plasmatici degli acidi grassi essenziali 20:3 n-9, 20:4 e 20:5 al termine della 2nd cABA e 2nd R-cABA

Dopo aver analizzato gli acidi grassi 18:3 n-3 e 18:2 n-6 abbiamo voluto valutare i livelli plasmatici di altri tre importanti acidi grassi. Come si può vedere nella figura 44 sono riportati i livelli di acido grasso 20:3 n-9 (A) nei quattro gruppi sperimentali. L'analisi statistica ANOVA a due vie non rileva significatività nell'interazione gruppi x tempo [$F_{(1,10)}=1.106$, $p=0.3178$]. Emerge però una differenza statistica fra i gruppi sperimentali [$F_{(1,10)}=40.14$, $p<0.0001$]. Queste differenze vengono ulteriormente confermate mediante l'unpaired t-test di Student. Infatti, come si può notare dal grafico, i livelli di 20:3 n-9 risultano aumentati al termine della 2nd cABA nel gruppo ABA rispetto ai *Controlli* [unpaired t-test di Student $t(10)=3.994$ $p=0.0025$] e l'aumento diventa più marcato al termine della 2nd R-cABA [unpaired t-test di Student $t(10)=3.170$ $p=0.0100$ *Controlli Recovery vs ABA Recovery*] anche rispetto al gruppo ABA [unpaired t-test di Student $t(10)=3.084$ $p=0.0116$ *ABA vs ABA Recovery*].

Nel grafico B della figura 44, è rappresentato l'acido arachidonico, 20:4. Il test statistico ANOVA a due vie non evidenzia differenze significative nell'interazione gruppi x tempo [$F_{(1,10)}=1.423$, $p=0.2604$]. La differenza statistica emerge fra i gruppi sperimentali [$F_{(1,10)}=42.73$, $p<0.0001$], evidenza che viene confermata anche mediante l'unpaired t-test. Nello specifico possiamo notare che l'acido arachidonico diminuisce nel gruppo ABA e ABA Recovery al termine sia della 2nd cABA che della 2nd R-cABA rispetto ai *Controlli* [$t(10)=4.710$ $p=0.0008$ *Controlli vs ABA*; $t(10)=8.345$ $p<0.0001$ *Controlli Recovery vs ABA Recovery*]. Per quanto riguarda l'acido grasso 20:5, in questo caso il test statistico ANOVA a due vie indica una differenza significativa nell'interazione gruppi x tempo [$F_{(1,10)}=69.03$, $p<0.0001$]. I livelli di acido grasso 20:5 risultano drasticamente diminuiti nel gruppo ABA al termine della 2nd cABA [unpaired t-test di Student $t(10)=5.683$ $p=0.0002$ *Controlli vs ABA*]. Nel gruppo ABA Recovery, le concentrazioni di acido grasso risultano in netto aumento, e non si assestano ai valori basali riferiti al gruppo dei *Controlli* [unpaired t-test di Student $t(10)=5.527$ $p=0.0003$ *Controlli vs ABA*; $t(10)=11.05$ $p<0.0001$ *ABA vs ABA Recovery*].

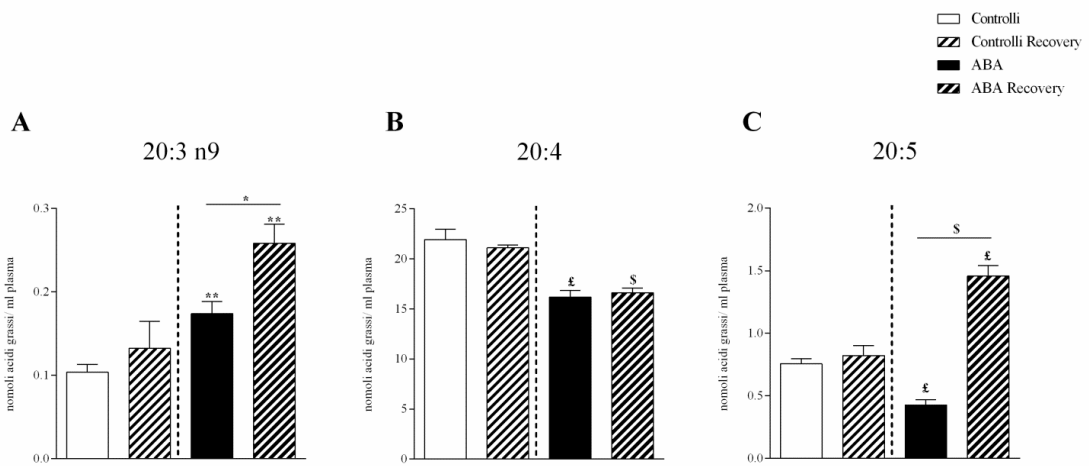


Figura 44. Livelli di acidi grassi **A)** 20:3 n-9, **B)** 20:4 e **C)** 20:5 nel plasma dei ratti *Controlli* e *ABA*. I dati sono espressi come media \pm SEM ($n=6$ animali per gruppo). L'analisi statistica *post-hoc* è stata effettuata mediante test di Bonferroni e l'unpaired t-test di Student: * $p<0.05$ *ABA* vs *ABA Recovery*; £ $p<0.001$ *Controlli* vs *ABA*; ** $p<0.01$ *Controlli* vs *ABA* e *Controlli Recovery* vs *ABA Recovery*; £ $p<0.001$ *Controlli* vs *ABA* e *Controlli Recovery* vs *ABA Recovery*; \$ $p<0.0001$ *Controlli* vs *ABA* e *Controlli Recovery* vs *ABA Recovery*.

4 Capitolo 4. Discussione

Nel modello da noi utilizzato il fenotipo simil-anoressico, che si instaura nelle ratte *ABA* durante l'*induzione*, conferma i dati precedentemente riportati in letteratura e nel nostro laboratorio (Scherma *et al.*, 2017). Come conseguenza della restrizione calorica a cui le ratte *ABA* sono sottoposte si ha un drammatico calo del peso corporeo e un aumento evidente dell'attività fisica in termini di RWA. Durante la fase di *induzione* con il progredire dei giorni, la combinazione di questi due fattori contribuisce, in modo sinergico, accentuando la perdita di peso.

La restrizione alimentare, come già mostrato in letteratura, porta ad un aumento dell'iperattività e sono numerosi i lavori che interpretano questo aspetto (Broocks *et al.*, 1990; Duclos *et al.*, 2005), molto importante anche nei pazienti anoressici. Nell'uomo, l'iperattività fisica è presente in circa il 30-80 % dei casi di anoressia (Davis *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 2007) ed è considerata un comportamento messo in atto dai pazienti per perdere peso e successivamente si aggrava trasformandosi in un comportamento incontrollato di tipo ossessivo compulsivo (Davis *et al.*, 1995). La riduzione dell'assunzione di cibo in combinazione con l'intensa attività fisica è stata descritta già nel 1874 (Gull, 1874) e poi confermata da numerose evidenze sperimentali (Hebebrand *et al.*, 2003b; Klein *et al.*, 2007). Di per se, l'attività fisica, in particolar modo la corsa, risulta gratificante causando il rilascio nel cervello di peptidi oppioidi endogeni (Adams, 2002). Nel test del T-maze, ratti sottoposti a questo protocollo sperimentale, scelgono il braccio del labirinto che li possa condurre all'utilizzo ad una ruota rotante (Hill, 1961). L'aumento dell'attività fisica nelle ratte *ABA* risulta essere in stretta correlazione con la diminuzione dell'assunzione di cibo e le basi di questo comportamento potrebbero risiedere nei meccanismi di gratificazione. La necessità di compensare la mancanza di cibo con un'altra esperienza gratificante potrebbe essere uno dei motivi che portano ad un aumento dell'attività fisica stessa. Inoltre, la necessità di effettuare attività fisica sia nei pazienti che negli animali, potrebbe essere un meccanismo messo in atto per contrastare i sintomi del deperimento e della fame (Keating, 2010).

4.1 Esperimento 1: studi di espressione genica e di regolazione epigenetica

In questo primo set di esperimenti nel protocollo ABA sono state individuate nei 6 giorni successivi due differenti fasi indicate come “precoce” (3 giorni di *induzione*) e “tardiva” (6 giorni di *induzione*). Al termine della *fase precoce* (3 giorni di *induzione*), i ratti ABA mostrano un fenotipo simil-anoressico con presenza di perdita di peso dovuta all’incremento progressivo dell’attività sulla ruota in combinazione alla restrizione alimentare, se paragonati ai loro livelli basali.

In questo set di esperimenti è stato considerato anche il gruppo sperimentale *ristretti*, ovvero sottoposto alla sola restrizione alimentare senza accesso alla ruota. Questi animali presentano anch’essi una diminuzione del peso corporeo anche se inferiore a quella dei ratti ABA (Scherma *et al.*, 2017). Questi dati confermerebbero che la restrizione alimentare (accesso al cibo per 90 minuti al giorno) combinata con attività fisica sulla ruota, siano fattori determinanti per la perdita del peso corporeo nei ratti ABA presente infatti già al terzo giorno dell’*induzione* (Routtenberg, 1968; Routtenberg e Kuznesof, 1967). La differenza nella perdita di peso fra il gruppo dei *Ristretti* e il gruppo ABA diventa più evidente e significativa nella *fase tardiva* (6 giorni di *induzione*). I *Controlli* che non sono esposti né alla restrizione alimentare né alla attività fisica sulla ruota, presentano una curva di crescita secondo valori standard, differenziandosi nettamente dagli altri due gruppi sperimentali.

Visto che la riduzione del peso corporeo e il progressivo aumento dell’attività fisica risultano evidenti già al terzo giorno dell’*induzione*, abbiamo deciso di considerare questo giorno come primo time-point (*fase precoce*) da paragonare al secondo e classico time point, ovvero il 6° giorno di *induzione* (*fase tardiva*) per l’analisi della regolazione trascrizionale di tutte le componenti del sistema endocannabinoide, importante per la sua rilevanza nella regolazione del bilancio energetico e per la motivazione appetitiva e il piacere legato al cibo (D’Addario *et al.*, 2014). Studi preclinici (Naruse *et al.*, 1991) e clinici (Beal *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 1983; Hein e Huyser, 2010) dimostrano che il sistema endocannabinoide può rappresentare un target terapeutico promettente nel trattamento dell’AN.

I nostri risultati riportano che tra le varie componenti del sistema endocannabinoide solo i livelli di espressione del gene *Cnr1* sono significativamente e selettivamente ridotti dopo 6 giorni sia nell’Hyp che nel NAcc dei ratti ABA. Nel gruppo

dei *Ristretti* la diminuzione dell'espressione del gene *Cnr1* non raggiunge valori significativamente differenti dai *Controlli*.

Per quanto riguarda il NAcc, possiamo vedere che al termine della *fase precoce*, è presenta una tendenza alla diminuzione dell'espressione genica di *Cnr1* nei ratti *ABA*, mentre non sono presenti differenze significative nei ratti *Ristretti* se paragonati ai *Controlli*. Al termine della *fase tardiva*, la tendenza alla diminuzione dell'espressione di *Cnr1* si fa significativa nel gruppo *ABA* rispetto ai *Controlli*, e anche il gruppo dei *Ristretti* mostra una tendenza alla diminuzione, seppur non statisticamente significativa.

In lavori di ricerca precedenti è stato dimostrato che i recettori CB1 modulano gli *input* sinaptici inibitori glutammatergici e GABAergici in diverse regioni del cervello, fungendo così da meccanismo di feedback regolatorio per controllare la trasmissione sinaptica e regolare l'assunzione di cibo (D'Addario *et al.*, 2014). La disregolazione del recettore CB1 è stata valutata anche nell'ipofagia, e i nostri dati confermerebbero ed estenderebbero i dati presenti in letteratura (Jbilo *et al.*, 2005; Nogueiras *et al.*, 2008), supportando ulteriormente un'associazione specifica del gene *Cnr1* con un comportamento alimentare ridotto.

Dati ottenuti nei nostri laboratori su animali *ABA*, attualmente in fase di pubblicazione, confuterebbero l'ipoattivazione del sistema endocannabinoide nell'AN. Infatti abbiamo riscontrato modificazioni dei livelli degli endocannabinoidi in diverse aree cerebrali (Collu *et al.*, 2019, *submitted*).

A livello cerebrale il sistema endocannabinoide interagisce con diversi sistemi neurotrasmettitoriali, in particolare nelle aree mesolimbiche, con la PFC, il NAcc, l'Amy e l'Hipp, svolgendo un ruolo cruciale nella gratificazione indotta dal consumo di cibo, e nell'Hyp, dove regola il rilascio di ormoni oressigenici ed anoressigenici (Di Marzo e Matias, 2005; Lau *et al.*, 2017; Scherma *et al.*, 2014). La somministrazione in aree cerebrali come Hyp e NAcc degli endocannabinoidi 2AG ed AEA provoca un incremento nell'assunzione di cibo e in particolar modo di cibo palatabile (Jamshidi e Taylor, 2001; Kirkham *et al.*, 2002; Soria-Gómez *et al.*, 2007). Il composto SR141716A, Rimonabant, un antagonista/agonista inverso dei recettori CB1, causa una diminuzione dell'assunzione di cibo ed una perdita di peso corporeo sia nell'uomo che nell'animale (Marzo e Després, 2009). Nei topi geneticamente modificati, in cui non è presente il recettore CB1, è stata messa in evidenza l'importante azione del sistema

endocannabinoide sull'assunzione di cibo e sul peso corporeo, profondamente alterati in questo modello animale (Cota *et al.*, 2003).

In animali obesi è stata vista una sovrattivazione del sistema e un aumento dei livelli di endocannabinoidi, e questi risultati sono stati riscontrati anche nei pazienti affetti da obesità (Alvheim *et al.*, 2013; Di Marzo *et al.*, 2001; Matias *et al.*, 2012). Topi knockout CB1 generati dalla delezione selettiva di *Cnr1* nell'Hyp hanno mostrato una riduzione del peso corporeo e un aumento del dispendio energetico, confermando il ruolo di CB1 nell'Hyp in particolar modo nel bilancio energetico (Cardinal *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda le specifiche regioni del cervello in cui sono state osservate alterazioni dell'espressione di *Cnr1*, si dovrebbe ricordare che i livelli di CB1 nell'Hyp sono rilevanti per la regolazione dello stress e dell'apporto energetico, il recettore CB1 si trova espresso nei neuroni ipotalamici che esprimono inoltre neuropeptidi anoressigeni, come l'ACTH e CRF (Cota *et al.*, 2003). Come accennato in precedenza, il deficit di CB1 in questa regione del cervello, attraverso strumenti farmacologici o genetici, è già stato dimostrato rilevante per l'assunzione di cibo (Cardinal *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 1998; Di Marzo *et al.*, 2001; Kirkham *et al.*, 2002). L'amministrazione di THC o AEA nell'Hyp induce l'assunzione di cibo anche negli animali sazi (Jamshidi e Taylor, 2001; Williams e Kirkham, 1999) e, coerentemente, gli antagonisti del CB1 hanno revertito questi effetti (Di Marzo e Matias, 2005; Matias e Di Marzo, 2007). La sotto-regolazione di *Cnr1* nell'Hyp è stata anche riportata sull'esposizione di topi al bisfenolo A, una sostanza chimica industriale inquinante dell'ambiente in grado di indurre segnali anoressigenici (Suglia *et al.*, 2016).

Abbiamo recentemente dimostrato che il trattamento subcronico con il THC, agonista naturale parziale per i recettori CB1/CB2 e con l'agonista sintetico CB1/CB2 (CP-55,940), è in grado di attenuare la perdita di peso corporeo e gli RWA nei ratti ABA. Queste variazioni non sono state scaturite dal trattamento con questi due agonisti nei ratti con la restrizione e con il solo esercizio fisico, suggerendo un effetto specifico sui ratti anoressici.

Questo effetto, sempre nel gruppo ABA, è accompagnato da un aumento dei livelli di leptina e da una diminuzione di corticosterone plasmatici, portando ad una stabilizzazione dell' HPA attraverso l'azione del sistema endocannabinoide (Scherma *et al.*, 2017). I dati emersi sui nostri ratti ABA che riportano una variazione riguardanti i

livelli di mRNA del gene *Cnr1* nell'Hyp, potrebbero essere dovuti ad un deficit energetico durante lo sviluppo della patologia. L'Hyp ha un ruolo centrale nella regolazione del comportamento alimentare tuttavia anche il NAcc è coinvolto nello sviluppo della patologia dell'AN (Jean *et al.*, 2007). Ricordiamo infatti che il NAcc è un nucleo molto importante nei meccanismi di *reward*, ma in particolare nell'aspetto edonico legato all'assunzione di cibo (Hoebel, 1985). Pertanto, i risultati da noi ottenuti per quanto riguarda i livelli di espressione di *Cnr1* nel NAcc nei ratti ABA sono di notevole interesse. Uno studio suggerisce che l'incremento dei livelli di endocannabinoidi nel NAcc potesse aumentare l'assunzione di cibo attraverso l'azione dei recettori CB1, mediante anche l'attivazione dei nuclei ipotalamici, supportando così l'importante relazione funzionale tra NAcc ed Hyp (Soria-Gómez *et al.*, 2007).

La restrizione alimentare in combinazione con l'esercizio fisico porta ad un aumento dei livelli di corticosterone esponendo i ratti ad una condizione di stress (Scherma *et al.*, 2017). Il corticosterone svolge un ruolo di regolazione negativa della trascrizione del gene per il recettore CB1 ed inoltre, in ratti esposti ad uno stress prolungato, sono stati rilevati nell'Hipp, diminuiti livelli di 2AG e dell'espressione dei recettori CB1 (Hill *et al.*, 2005; Maillieux e Vanderhaeghen, 1993). La prolungata restrizione alimentare porta ad una riduzione del tono endocannabinoide e questo potrebbe essere un meccanismo messo in atto dall'organismo per ridurre l'appetito e la motivazione verso il cibo (Fride *et al.*, 2005). L'inattivazione dei recettori CB1 determina una riduzione dell'assunzione di cibo dovuta all'inibizione dell'aspetto edonico legato al mangiare (De Vry *et al.*, 2004; Di Marzo *et al.*, 2001; Rowland *et al.*, 2001).

Complessivamente, la riduzione dell'espressione di *Cnr1* nell'Hyp potrebbe essere vista come una parziale perdita del bisogno di ripristinare l'omeostasi energetica, mentre la down-regulation nel NAcc potrebbe essere collegata all'anedonia, che potrebbe verificarsi durante lo sviluppo del fenotipo.

Per comprendere meglio i meccanismi coinvolti nella regolazione trascrizionale dei *Cnr1* abbiamo voluto verificare eventuali modificazioni epigenetiche a carico di questo gene, analizzando la metilazione nella regione promotrice. Dalle analisi è emerso un aumento significativo dei markers epigenetici nel NAcc dei ratti ABA al termine dei sei giorni della fase di *induzione*, mentre non ci sono differenze nell'Hyp.

La metilazione del DNA è stata valutata nel sangue di pazienti anoressiche e risulta collegata con le alterazioni di geni importanti nella regolazione del comportamento alimentare (Ehrlich *et al.*, 2010; Frieling *et al.*, 2010, 2007). In un modello animale in cui essi mostrano un comportamento di dipendenza nei confronti del cibo, è stata vista una correlazione tra l'espressione del gene *Cnr1* e il suo stato di metilazione nella regione promotrice (Mancino *et al.*, 2015). In uno studio condotto nei laboratori del Dott. D'Addario all'Università di Teramo, l'indagine genetica effettuata sulle nostre ratte ABA è stata parallelamente messa in atto anche nel modello genetico di AN *anx/anx* in cui gli animali a causa della mutazione di questo gene esibiscono scarso appetito, anomalie neurobiologiche e neurodegenerazione (Lindfors *et al.*, 2011). Nel modello genetico non sono state rilevate modificazioni a carico dei livelli di mRNA delle componenti del sistema endocannabinoide nel NAcc e nell'Hyp, né a carico dei markers epigenetici che invece appaiono modificati nel nostro modello ABA.

I risultati dei nostri studi ci portano a focalizzare la nostra attenzione sugli stimoli ambientali, quali la restrizione di cibo e l'attività sulla ruota, e come questi possano determinare le variazioni genetiche presenti nelle ratte sottoposte al regime ABA, non confutando quindi la possibilità di una predisposizione genetica. L'attività fisica sarebbe l'elemento che contribuisce maggiormente a queste modificazioni che non sono infatti riscontrabili nel gruppo di ratti *Ristretti* ovvero sottoposti alla sola restrizione alimentare (Fadda *et al.* 2018, *submitted*).

Una possibile limitazione di queste analisi è dovuta al fatto che stiamo basando le nostre osservazioni su un modello animale che non riproduce tutti i tratti dell'AN tipici dell'uomo, soprattutto quelli legati all'aspetto psicologico (Casper *et al.*, 2008; Klenotich e Dulawa, 2012). Il modello ABA riproduce per certo alcune delle più importanti caratteristiche della patologia e in esso possiamo riscontrare diverse alterazioni neurobiologiche tipiche dei pazienti affetti da AN: l'iperattività fisica, la perdita di peso e le alterazioni ormonali (Scherma *et al.*, 2017). I dati ottenuti fanno presupporre per la prima volta che ci sia una regolazione selettiva e tempo-dipendente del gene *Cnr1*, in aree come l'Hyp e il NAcc in ratti esposti al modello ABA e che le medesime alterazioni non siano riscontrabili nel modello genetico avvalorando maggiormente l'ipotesi che siano alterazioni legate al comportamento e alle condizioni imposte dal modello.

4.2 Esperimento 2: livelli DA, DOPAC e HVA e densità dei recettori D2

In questo secondo set di esperimenti, detto *esperimento 2*, il protocollo ABA è stato applicato in modo classico ovvero una fase di *induzione* (6 giorni) seguita da una fase di *recovery* (7 giorni).

Questo studio è stato impostato in modo da poter analizzare il possibile ruolo del sistema dopaminergico nell'insorgenza e nella progressione della AN. In seguito alla fase di *induzione*, gli animali iniziano una successiva fase detta di *recovery* in cui recuperano il loro peso corporeo grazie ad un regime di dieta *ad libitum* mantenendo però libero accesso alle ruote 24/24 ore (Ratnovsky e Neuman, 2011). In questa fase di *recovery* gli animali ABA consumano una quantità di cibo maggiore rispetto ai *Controlli*, e questo aumento nelle quantità di cibo consumato è probabilmente dovuto alla necessità di recuperare il peso corporeo perso durante il periodo di intensa restrizione calorica (Kaye *et al.*, 1988, 1986). La fase di ristorazione è accompagnata ad una diminuzione a breve termine dell'attività fisica ed è associata spesso ad iperfagia che talvolta persiste anche diversi giorni dopo il recupero del peso corporeo. L'iperfagia potrebbe essere dovuta al fatto che i ratti in *recovery* rimangono sensibili ai segnali oressigenici che sono scaturiti dalla perdita di peso corporeo durante la fase di *induzione* e questo è dovuto anche all'azione della leptina che è notevolmente ridotta a causa della perdita di tessuto adiposo (Scherma *et al.*, 2017). Come è stato dimostrato precedentemente anche nel nostro laboratorio (Scherma *et al.*, 2017) i livelli di leptina sono decisamente diminuiti e questo fa sì che vengano attivati i segnali oressigenici che stimolano l'appetito e contemporaneamente riducono i segnali di sazietà (Woods *et al.*, 2000). Inoltre è stato visto che nel modello ABA il trattamento con leptina di ratti maschi previene l'aumento dell'attività fisica sulla ruota associata alla restrizione alimentare (Exner *et al.*, 2000). Questo suggerisce che la diminuzione del segnale leptinergico associato con la perdita di tessuto adiposo risulta nell'eccessivo aumento dell'attività fisica.

I neuroni dopaminergici della VTA innervano il NAcc, l'Amy e la PFC, mentre i neuroni presenti nella SN innervano la CPu. Questi circuiti neurali sono implicati negli aspetti edonici ed omeostatici del consumo di cibo e, spesso, risultano alterati in risposta ad uno stato di malnutrizione.

Nella PFC è presente un aumento significativo dei livelli di DA al termine dell'*induzione* nei ratti *ABA*. Tale aumento torna ai valori di controllo al termine della *recovery*. La PFC è implicata nel controllo inibitorio dei meccanismi legati all'assunzione di cibo. In persone affette da BED e da alcune forme di obesità l'attività basale della PFC risulta diminuita (Moore e Bokor, 2017; Volkow *et al.*, 2008). Lesioni a carico della PFC causano afagia e adipsia nei ratti (Kolb e Nonneman, 1975). I recettori D1 sono altamente espressi nella PFC, in particolare in quella mediale (mPFC) e ci sono numerose evidenze che dimostrano il loro coinvolgimento nella regolazione del comportamento alimentare e risultano attivati durante l'assunzione di cibo nei topi (Land *et al.*, 2014). È stato visto che il gene COMT che codifica per l'enzima di degradazione della DA è soggetto ad un tipo di polimorfismo che porta ad una proteina con un potere metabolico ridotto. Questa disfunzione ha un impatto molto importante a livello della PFC e questo polimorfismo è spesso associato a patologie psichiatriche. Studi recenti hanno suggerito che il gene COMT potesse essere associato con la predisposizione genetica all'AN e che individui omozigoti per l'allele associato alla forma altamente attiva hanno un maggior rischio di sviluppare la patologia (Frisch *et al.*, 2001). Diversi studi attestano un aumento dell'attività dopaminergica nella mPFC durante l'alimentazione in seguito a periodi di deprivazione di cibo (Carlson *et al.*, 1987). La somministrazione di cibi palatabili porta ad un aumento dei livelli di DA in ratti sazi (Bassareo *et al.*, 2002; Gambarana *et al.*, 2001) così come si trova un aumento di DA in risposta a stimoli di *reward* legati al cibo (Bassareo *et al.*, 2002; D'Angio e Scatton, 1989; Gambarana *et al.*, 2001).

Un altro aspetto molto importante è il ruolo della DA nel rinforzo legato al cibo in seguito a periodi di restrizione alimentare (Moscarello *et al.*, 2010). Gli aumentati livelli di DA riscontrati nei nostri animali *ABA* al termine dell'*induzione* sarebbero in accordo con diversi lavori scientifici che dimostrano l'importante ruolo dopaminergico nei meccanismi di *reward* in cui quest'area cerebrale è ampiamente coinvolta. Non solo, come descritto sopra, in persone obese l'attività dopaminergica nella PFC risulta diminuita, al contrario noi osserviamo un aumento dei livelli dopaminergici nei nostri ratti che si trovano in una condizione di forte malnutrizione.

A livello della CPu il DOPAC risulta diminuito nei ratti *ABA* al termine della *recovery*. La CPu è una regione altamente implicata nei meccanismi legati al consumo

di cibo, contiene i neuroni GABAergici che proiettano a diverse regioni cerebrali come la SN, la VTA, l'Hyp e altre ancora (Obeso *et al.*, 2000). La maggior parte degli *input* che riceve la CPu provengono dalla corteccia e dal talamo ma anche e soprattutto dai neuroni dopaminergici mesencefalici (Lindvall, 1983). La CPu appunto è innervata dai neuroni dopaminergici che provengono dalla SN pars compacta, mentre la parte ventrale dell CPu, il NAcc, è innervato dai neuroni dopaminergici provenienti dalla VTA. L'inibizione dell'attività dopaminergica porta ad una serie di problematiche sensorimotorie, inclusa l'ipofagia. Questo suggerisce che la regolazione del rilascio di DA nella CPu è importante per integrare i segnali provenienti dalla corteccia e regolare l'assunzione di cibo (Marshall *et al.*, 1980; Zhou e Palmiter, 1995). L'ablazione bilaterale dei neuroni dopaminergici nella CPu determina malnutrizione come anche l'inibizione della tirosina idrossilasi nei neuroni dopaminergici della VTA o della SN confermando l'importante ruolo della DA in quest'area nella regolazione dell'assunzione di cibo (Ungerstedt, 1971; Zhou e Palmiter, 1995).

I ratti *ABA* presentano nel NAcc, al termine dell'*induzione*, un aumento dei livelli di DA rispetto ai *Controlli* e questa differenza diminuisce ma non torna ai valori dei controlli al termine della *recovery*, mostrando quindi solo un parziale ritorno ai valori in assenza di AN.

Il principale metabolita della DA, il DOPAC, diminuisce nel NAcc dei ratti del gruppo *ABA* al termine dell'*induzione* rispetto ai *Controlli* ed in modo anche maggiormente significativo al termine della *recovery*.

La DA svolge un ruolo di regolazione molto importante a livello del NAcc per quanto riguarda l'attività motoria ed il consumo di cibo. La lesione dei neuroni dopaminergici del NAcc o la somministrazione in area di antagonisti dopaminergici determinano una diminuzione dell'attività motoria (Kelley *et al.*, 2005). E' stato inoltre dimostrato che la deplezione della DA o il blocco dei suoi recettori nel NAcc è in grado di inibire l'attività fisica che precede il consumo di cibo (FAA) (Barbano e Cador, 2006; McCullough e Salamone, 1992). Uno studio condotto da Verhagen e collaboratori, ha dimostrato un aumento di DA e dei suoi metaboliti, nei ratti *ABA* durante l'assunzione di cibo. I nostri risultati e quelli di Verhagen coincidono, ovvero in entrambi, sebbene in condizioni sperimentali leggermente differenti, vengono osservati un aumento dei livelli DA.

L'iperattività come precedentemente spiegato, è una delle caratteristiche chiave della patologia. Un aumento dell'attività fisica durante la restrizione alimentare può essere inizialmente funzionale e fisiologica, ma successivamente diventa gratificante (Scheurink *et al.*, 2010). L'attività fisica, ed in particolare la corsa, risultano essere esperienze gratificanti ed è stato visto, mediante il test comportamentale T-maze, che i ratti scelgono di percorrere il braccio dell'apparato utilizzato per il test, che li porta direttamente all'utilizzo di una ruota oppure premono maggiormente la leva che gli consente di poterne utilizzare una (Hill, 1961; Hoffmann *et al.*, 1990). È stato dimostrato che l'attività fisica attiva i medesimi circuiti mesolimbici dopaminergici che vengono attivati dalle sostanze d'abuso (Balfour, 2004; Fadel e Deutch, 2002; Ferreira *et al.*, 2006; Kanarek *et al.*, 1998; Kringelbach e Berridge, 2009; Volkow *et al.*, 2008).

Sia le droghe che l'attività fisica portano ad un aumento del rilascio di DA nei circuiti della gratificazione e alterano il legame della DA ai suoi recettori (Chaouloff, 1989; Foley e Fleshner, 2008; Smith e Schneider, 2008).

Infatti, l'attività sulla ruota è in grado di alterare l'espressione di recettori specifici nel sistema dopaminergico mesolimbico e mesostriatale ed aumentare i livelli di Δ FosB nel NAcc (Werme *et al.*, 2002, 2000). Specificatamente nel modello ABA sono stati eseguiti diversi studi per dimostrare l'importante ruolo dell'iperattività nella gratificazione. La deplezione della DA ed il blocco dei recettori D1 o D2 riduce l'attività fisica legata al cibo, ovvero la FAA (Barbano e Cador, 2006; McCullough e Salamone, 1992).

Riassumendo possiamo presupporre che l'aumento dei livelli di DA nel NAcc sia dovuto all'importante iperattività che si instaura nelle ratte ABA, l'attività fisica mediante la ruota costituisce un'esperienza gratificante per gli animali attivando i circuiti di *reward* di cui abbiamo accennato sopra. Inoltre, durante la *recovery*, nonostante le ratte ABA ricevano un'alimentazione *ad libitum* ed i primi giorni di ristorazione riducano significativamente l'attività fisica, questa poi aumenta nuovamente, indice del fatto che l'esperienza gratificante ha attivato in maniera importante i sistemi di gratificazione. La DA al termine della *recovery* non torna infatti ai livelli dei *Controlli*, rimanendo significativamente elevata rispetto ad essi.

Per quanto riguarda i livelli di DOPAC, sempre nel NAcc delle ratte ABA, risultano diminuiti al termine della fase di *induzione* mentre non ci sono variazioni nei

livelli di HVA. Studi precedenti hanno analizzato i livelli di DA nelle urine di pazienti affette da AN che sono risultati aumentati mentre non sembrano esserci differenze per quanto riguarda i livelli di DOPAC ed HVA (Van Binsbergen *et al.*, 1991). Al contrario, in uno studio condotto da Riederer e collaboratori sono stati trovati ridotti livelli di DOPAC nelle pazienti anoressiche (Riederer *et al.*, 1982). La secrezione delle catecolamine ed il loro metabolismo dipendono anche dallo stato nutrizionale e dall'attività fisica dei soggetti in questione. Molte delle pazienti prese in esame in questo studio di Riederer e collaboratori, presentavano elevata iperattività e insieme, alla ridotta secrezioni dei metaboliti catecolaminergici, questa condizione può contribuire ad una iperattivazione del sistema catecolaminergico (Riederer *et al.*, 1982). I nostri studi in linea con quelli di Riederer e collaboratori, sembrerebbero supportare questa tesi, in quanto anche nel nostro modello ABA assistiamo ad una diminuzione dei livelli di DOPAC, pur non riscontrando lo stesso andamento per l'HVA. Così come nei pazienti, anche nei nostri animali ABA, l'iperattività e il forte stato di malnutrizione durante la fase di *induzione*, potrebbero essere alla base di questa alterazione nella secrezione dei metaboliti catecolaminergici. Questa condizione non viene revertita nonostante il periodo di *recovery*, e questo potrebbe far presupporre che gli effetti dell'attività fisica influenzino maggiormente, rispetto alla carenza energetica, l'alterato bilanciamento dei livelli del metabolita DOPAC. Ulteriori studi delucidativi potrebbero essere volti ad investigare l'attività enzimatica degli enzimi di degradazione della DA.

A livello ipotalamico il DOPAC diminuisce nei ratti ABA al termine della *recovery* rispetto ai ratti ABA al termine dell'*induzione*, mentre non ci son differenze nei livelli di DA. Le fibre dopaminergiche che proiettano dalla VTA alla SN e all'Hyp influenzano il comportamento alimentare (Wellman, 2005). Queste fibre agiscono sui nuclei ventromediali e laterali dell'Hyp e possiedono effetti opposti sul cibo: la DA nel nucleo ventromediale aumenta il consumo di cibo, mentre nel nucleo laterale dell'Hyp lo inibisce (Vucetic e Reyes, 2010). L'iperattività degli animali in seguito a restrizione di cibo è dovuta proprio all'aumento di DA nell'Hyp. La restrizione calorica porta ad una diminuzione della DA nell'Hyp medio basale e di contro questa diminuzione viene bilanciata da un aumento dell'iperattività (Broocks *et al.*, 1990).

Nell'Hyp degli animali ABA non sono presenti differenze significative di DA e DOPAC né al termine della fase di *induzione* né della fase di *recovery*. La presenza di

diversi nuclei ipotalamici, dal punto di vista anatomico, complesso da dissezionare, rende difficile la quantificazione dei livelli di DA nei nostri animali *ABA* (*Hyp in toto*) che pertanto non mostrano variazioni anche nel metabolita DOPAC.

L'analisi della densità dei recettori D2 nel NAcc delle ratte *ABA* rispetto ai *Controlli* ha mostrato, nella porzione della Shell, una differenza significativa fra i gruppi sperimentali, più precisamente un aumento della densità dei recettori D2. I valori di densità di tali recettori tornano nella norma al termine della fase di *recovery*.

Studi sull'uomo hanno dimostrato una sovra-regolazione dei recettori D2/D3 nella CPU ventrale dei pazienti anoressici, ed in generale è stato visto che gli anoressici provano maggior piacere nel vedere immagini di persone magre e sentimenti negativi invece, nel vedere immagini di persone sovrappeso (Frank *et al.*, 2005). L'utilizzo di un antagonista dopaminergico come l'olanzapina, migliora la sintomatologia *ABA* nei topi, diminuendo l'attività fisica ed aumentando il consumo di cibo, suggerendo quindi che questi recettori possano essere coinvolti nella patologia (Klenotich e Dulawa, 2012). Il Core e la Shell del NAcc ricevono afferenze da diverse aree corticali e questo suggerisce una diversità funzionale dei due nuclei. L'abuso di sostanze stimola il rilascio di DA maggiormente nella Shell rispetto al Core. La Shell inoltre è più sensibile allo stress rispetto al Core ed inoltre è coinvolto maggiormente negli aspetti edonici legati al cibo. Non solo, questo nucleo media le proprietà di rinforzo dovute ad uno stimolo nuovo e piacevole, ma presenta una densità di recettori dopaminergici e livelli di DA maggiori rispetto al Core (Heimer *et al.*, 1997). L'importante effetto di *reward* dovuto all'attività fisica potrebbe essere legato all'aumento del binding recettoriale riscontrato nella Shell dei ratti *ABA* rispetto al nucleo del Core.

Nel modello animale *ABA* è stata analizzata la densità dei recettori D2 nella CPU dei topi con fenotipo simil-anoressico ed è stata vista una diminuzione nell'espressione di questi recettori. Questo potrebbe suggerire una diminuzione nei livelli di DA nella via nigrostraitale a causa della restrizione calorica, che porterebbe ad una sovra-regolazione dei recettori D2 nella CPU (Gelegen *et al.*, 2008). Topi geneticamente modificati, che non sono in grado di sintetizzare DA (dopamine deficient mice), presentano una condizione di ipofagia e tendono a non nutrirsi morendo successivamente per malnutrizione (Palmiter, 2008; Szczypka *et al.*, 1999). Il ripristino dell'attività dopaminergica nella sola CPU induce gli animali ad alimentarsi prevenendo

lo stato di malnutrizione (Szczyпка *et al.*, 2001). Se il segnale dopaminergico viene ripristinato solo a livello del NAcc questo non accade. Viene aumentato il consumo di cibo palatabile ma non in maniera sufficiente per la sopravvivenza dell'animale (Szczyпка *et al.*, 2001). Questo mostra l'importante ruolo di quest'area nel mediare gli aspetti motivazionali che sono legati al nutrimento e che regolano il bilanciamento energetico necessario per la sopravvivenza. Viceversa, il NAcc ha un ruolo predominante nella gratificazione indotta dal cibo e nell'incentivare comportamenti appetitivi verso cibi altamente calorici e palatabili, tutti aspetti legati alla componente edonica dell'assunzione di cibo (Palmiter, 2008.; Wang *et al.*, 2002).

Precedenti studi effettuati su pazienti AN hanno valutato i livelli nella CPU dei recettori D2 al termine di un periodo di *recovery* dalla patologia. In entrambi gli studi non sono emerse differenze significative così come anche nel lavoro pubblicato da Broft e collaboratori nel quale hanno effettuato le indagini in pazienti che si trovavano nello stadio acuto della patologia (Broft *et al.*, 2015). La differenza nella densità recettoriale rilevata nei nostri animali può essere diversa da quella non presente negli studi sull'uomo proprio perché le analisi sono state condotte in specie differenti. Inoltre, l'aumento della densità recettoriale dei recettori D2 nella CPU potrebbe essere anche in questo caso imputabile alla combinazione di restrizione alimentare ed esercizio fisico. La CPU svolge un ruolo molto importante nei meccanismi di *reward* e anche questo dato da noi ottenuto sosterebbe l'effetto gratificante che la ruota procura nelle ratte ABA.

4.3 Esperimento 3: fase acuta e cronica del protocollo activity-based anorexia e analisi delle componenti lipidiche plasmatiche negli animali.

Sono pochi i protocolli sperimentali che hanno utilizzato la restrizione alimentare combinata con l'esercizio fisico per lunghi periodi di tempo. Frintrop e collaboratori hanno utilizzato il protocollo ABA in topi adolescenti, modificandolo in modo da esporre gli animali ad una fase acuta di restrizione alimentare in cui gli animali ricevevano il 40% del cibo consumato rispetto al gruppo di controllo che riceveva cibo *ad libitum*, raggiungendo così una perdita di peso corporeo del 20-25% rispetto ai valori basali. Per mantenere la perdita di peso ottenuta, la quantità di cibo veniva modificata giornalmente (Frintrop *et al.*, 2018). Méquignon e collaboratori, invece, hanno utilizzato

il modello ABA sottoponendo topi femmine adulte a due differenti protocolli, uno di breve durata ed uno di lunga durata, con lo scopo di valutare l'effetto dell'attività fisica e della restrizione alimentare su diversi parametri fisiologici. Gli animali, anche in questo caso, erano sottoposti ad una restrizione calorica di tipo quantitativo e non temporale (Méquinion *et al.*, 2015).

Un aspetto molto importante dell'AN è la restrizione alimentare che le persone affette dalla patologia si impongono volontariamente. Questa è un situazione molto difficile da attuare negli animali in condizioni sperimentali. Sebbene il modello ABA riesca a mimare le principali caratteristiche della patologia, presenta delle limitazioni che rendono impossibile riprodurre gli aspetti prettamente psicologici.

L'AN come precedentemente descritto, è caratterizzata da fasi acute in cui i pazienti vengono ospedalizzati e durante le quali ricevono le terapie che possono avere un esito positivo. L'altra caratteristica dell'AN è l'elevato tasso di recidività e di cronicità. Il tasso di ricaduta è molto alto e porta ad uno stato cronico della patologia che rende difficile l'efficacia delle terapie stesse. Per queste ragioni ci siamo posti l'obiettivo di modificare il protocollo ABA utilizzato nella prima parte della tesi per cercare di riprodurre la cronicità e la recidività tipica dell'AN.

Le ratte *ABA* sono state sottoposte in una prima fase sperimentale ad un periodo definito "fase acuta". Durante questo periodo sono state sottoposte a tre fasi acute consecutive (*aABA* ovvero acute ABA) di *induzione* (1^{st} *aABA*, 2^{nd} *aABA*, 3^{rd} *aABA*), ciascuna seguita da un periodo di *recovery* (1^{st} *R-aABA*, 2^{nd} *R-aABA*, 3^{rd} *R-aABA*).

In questa fase sperimentale, abbiamo caratterizzato per la prima volta un modello cronico di AN modificando il modello in acuto ABA, mantenendo le caratteristiche chiave della patologia, come la perdita di peso e l'elevata iperattività.

Successivamente alla fase acuta, le ratte hanno proseguito il percorso con una "fase cronica" (*cABA* ovvero chronic ABA) durante la quale venivano esposti a restrizione alimentare (90 minuti al giorno) per un periodo prolungato. Durante queste due fasi croniche, (1^{st} *cABA* e 2^{nd} *cABA*), gli animali hanno mantenuto le stesse condizioni del protocollo usato nelle fasi precedenti (accesso al cibo 90 minuti al giorno, libero accesso alla ruota). L'unica differenza è stata quella di far accedere gli animali alle successive fasi di *recovery* (1^{st} *R-cABA* e 2^{nd} *R-cABA*) soltanto una volta

raggiunta una perdita di peso del 20-25 % del peso basale (riferimenti: paragrafo 2.4 e figura 18).

L'induzione della fase acuta è stata attuata per cercare di rendere gli animali vulnerabili alle successive fasi croniche.

Durante la fase acuta gli animali, ad ogni stadio di *induzione*, hanno sempre dimostrato un fenotipo simil-anoressico, con una marcata perdita di peso ed iperattività. L'attività fisica è risultata sempre maggiore rispetto ai valori basali.

Durante le fasi di *recovery* gli animali, hanno poi recuperato il peso corporeo. Al termine della 3rd *R-aABA* il peso dei ratti *ABA* tendeva a superare, seppur di poco quello dei ratti *Controlli*, in accordo con una maggiore consumo di cibo. E' stato dimostrato che il protrarsi dello stato di malnutrizione causa comportamenti di iperfagia riscontrati in ratti sottoposti a questo modello sperimentale di AN (Kaye *et al.*, 1988, 1986).

Nella fase cronica, gli animali per perdere la quantità di peso necessaria per poterli definire anoressici hanno necessitato di periodi di induzione più lunghi dei sei giorni che hanno sempre caratterizzato le *induzioni* della fase acuta. Gli animali hanno comunque presentato un livello elevato di attività fisica rispetto a quello basale e la quantità di peso corporeo perso è stata maggiore al termine degli stadi di restrizione della fase cronica rispetto a quella acuta. Questo potrebbe essere in parte anche dovuto al consumo di cibo, che risulta leggermente aumentato rispetto agli stadi della fase acuta. L'incremento riscontrato potrebbe essere dovuto ad un adattamento fisiologico da parte dell'animale che ha ricevuto un restrizione di cibo temporale e non quantitativa. L'accesso al cibo ha avuto inizio per tutta la durata del protocollo sperimentale sempre allo stesso orario, alle ore 12:00, ovvero all'inizio della fase di buio.

In questi animali viene mantenuto un elevato livello di iperattività che tende a diminuire ritornando ai valori basali solo durante l'ultima fase di *recovery*, la 2nd *R-cABA*. Questo è in parte spiegabile con i comportamenti di iperfagia messi in atto dalle ratte *ABA* per recuperare il dispendio energetico proprio del lungo periodo di restrizione calorica della 2nd *cABA*.

Al termine della 2nd *cABA* il peso del fegato nei ratti *ABA* era inferiore rispetto a quello dei *Controlli*, così come il peso del VAT. In entrambi i casi l'effetto della

restrizione alimentare e dell'intensa attività fisica hanno fatto in modo che si attuasse una drastica riduzione del tessuto adiposo.

Il fegato è uno degli organi maggiormente coinvolti nelle complicanze mediche che si sviluppano in questa patologia, ed è stato osservato che gli epatociti di pazienti anoressiche presentano segni di necrosi e apoptosi spiegando così gli elevati livelli di aminotransferasi riscontrati in diversi casi (Kheloufi *et al.*, 2014). Al termine della 2nd *R-cABA* il tessuto adiposo ha recuperato la sua massa ma non ha comunque raggiunto il peso di quello dei *Controlli*. Il peso del fegato dei ratti *ABA* al termine della *recovery* è risultato maggiore di quello dei *Controlli*.

Nei pazienti anoressici spesso si assiste a quella che viene chiamata “sindrome da rialimentazione” (SDR), una sindrome potenzialmente letale che si manifesta nei primi giorni dopo l'avvio delle terapie di rialimentazione. La SDR viene definita come “uno spostamento potenzialmente fatale di fluidi ed elettroliti che può avvenire in pazienti malnutriti che ricevono una ri-alimentazione naturale o artificiale (sia enterale che parenterale)” (Solomon e Kirby, 1990). Questo spostamento dipende da cambiamenti ormonali e metabolici e può determinare complicanze cliniche gravi. La più importante caratteristica biochimica della SDR è l'ipofosforemia. Tuttavia, la sindrome è complessa e può mostrare anche alterazioni del bilancio del sodio e dei liquidi, del metabolismo glucidico, proteico e dei grassi, deficit di tiamina, ipopotassiemia e ipomagnesiemia (Perreault *et al.*, 1997). Uno degli aspetti che suscita particolare interesse della SDR sono le steatosi epatiche e le steatoepatiti. Queste sono attribuite all'accumulo di grasso a livello epatocitario dovuto all'eccessivo introito di carboidrati in pazienti con un alto livello di malnutrizione (Vootla e Daniel, 2015). Nei ratti *ABA* potrebbe essersi verificato quello che spesso si riscontra nei pazienti, la dieta *ad libitum* al quale vengono esposti, li consente di mangiare una grande quantità di cibo esponendoli quindi ad un accumulo a livello epatico di tessuto adiposo che spiegherebbe il motivo per cui il peso del fegato supera in maniera così marcata quello dei *Controlli*.

La perdita di peso è spesso il risultato di un ridotto apporto calorico, soprattutto un ridotto apporto di grassi, con ridotta assunzione di acidi grassi essenziali come ALA e LA. In pazienti anoressiche sono stati condotti diversi studi per valutare la composizione degli acidi grassi plasmatici. Zak (Zák *et al.*, 2005) e Holman (Holman *et*

al., 1995) hanno riscontrato differenti livelli di EFA nel plasma delle pazienti anoressiche. I livelli di LA talvolta risultano aumentati (Holman *et al.*, 1995b) o tendenti alla diminuzione (Zák *et al.*, 2005), mentre i livelli di ALA si dimostravano diminuiti (Holman *et al.*, 1995b) oppure invariati (Langan e Farrell, 1985). Al termine della 2nd cABA nelle ratte ABA si evidenziano ridotti livelli di EFA in particolare di ALA e LA che non possono essere sintetizzati *de novo* dall'organismo ma devono essere assunti dalla dieta. Questo è in accordo con i sopracitati dati clinici presenti in letteratura, in cui le pazienti anoressiche mostrano ridotti livelli di questi acidi grassi. Questi due acidi grassi sono importanti perché precursori di altri acidi grassi insaturi a lunga catena che ricoprono diversi ruoli fisiologici. Al termine della 2nd R-cABA i livelli di ALA e LA vengono ripristinati poiché le ratte ABA ricevono un'alimentazione *ad libitum* bilanciata in ogni suo componente (acidi grassi, proteine ecc.) e pertanto i livelli di EFA vengono ripristinati.

In assenza di LA e di ALA o di altri PUFA, l'acido oleico che è il più abbondante acido grasso insaturo presente nei tessuti, viene velocemente desaturato e questo step è susseguito dall'elongazione che conduce alla formazione degli acidi grassi PUFA della famiglia n-9. La desaturasi $\Delta 6$ inserisce un doppio legame nella posizione 6-7 e la desaturasi $\Delta 5$ invece nella posizione 5-6 della catena carboniosa dell'acido grasso. Nella stessa maniera, l'acido palmitoleico viene convertito per formare gli acidi grassi della serie n-7. Quando ci troviamo in carenza di EFA, la conseguenza diretta è un accumulo di acido grasso eicosatrienoico, 20:3 n-9, nei tessuti, e questo è stato riscontrato anche nel plasma delle pazienti anoressiche da Hollman e collaboratori (Holman *et al.*, 1995b). Questi valori alterati li ritroviamo anche nelle nostre ratte ABA al termine della 2nd cABA, dove assistiamo ad un aumento della sintesi di 20:3 n-9 che aumenta in maniera più marcata al termine della 2nd R-cABA, e questo probabilmente potrebbe essere dovuto al fatto che avendo indotto in maniera massiva gli enzimi durante la fase precedente di restrizione così prolungata, l'*induzione*, rimangono attivi anche in fase di *recovery*. La deficienza di EFA è un fenomeno che accade anche in assenza di malnutrizione, una dieta sbilanciata in grassi porta ad un mal consumo di ALA e LA, l'accumulo di 20:3 n-9 potrebbe essere prevenuto con un'assunzione di LA pari all' 1% del consumo energetico totale giornaliero (FAO/WHO, Fats and oils in human nutrition, 1994).

Come ci aspettavamo, corroborando i dati presenti nelle pazienti, gli acidi grassi 20:4 e 20:5 derivanti dall'ALA risultano nettamente diminuiti a causa della mancanza del suo precursore, soltanto il 20:5 riesce a superare i livelli dei *Controlli* al termine della 2nd R-cABA, l'AA invece rimane basso nonostante i livelli del suo precursore risultino ripristinati.

La diminuzione nei livelli di AA è controbilanciata dall'aumento di 20:3 n-9 come descritto sopra (Ratnayake e Galli, 2009). La diminuzione di AA è dovuto anch'essa alla restrizione alimentare, infatti una dieta ad alto contenuto in grassi comporta un incremento di AA nel fegato e nei globuli rossi e questo induce un aumento dell'assunzione di cibo, di leptina nel sangue e una possibile attivazione dei recettori cannabinoidergici (Alvheim *et al.*, 2012). Al contrario, come è stato dimostrato nei nostri animali ABA (Scherma *et al.*, 2017), i livelli di leptina sono drasticamente ridotti e questo supporta ulteriormente l'ipotesi che alla base della drastica riduzione dell'AA ci sia la restrizione alimentare.

In conclusione possiamo dire che i livelli alterati di acidi grassi nel plasma delle ratte ABA, supportano i dati presenti in letteratura, e sono dovuti al forte e prolungato stato di malnutrizione instaurato durante il protocollo cronico ABA.

Il nostro modello quindi potrebbe essere davvero considerato un buon modello di AN cronica.

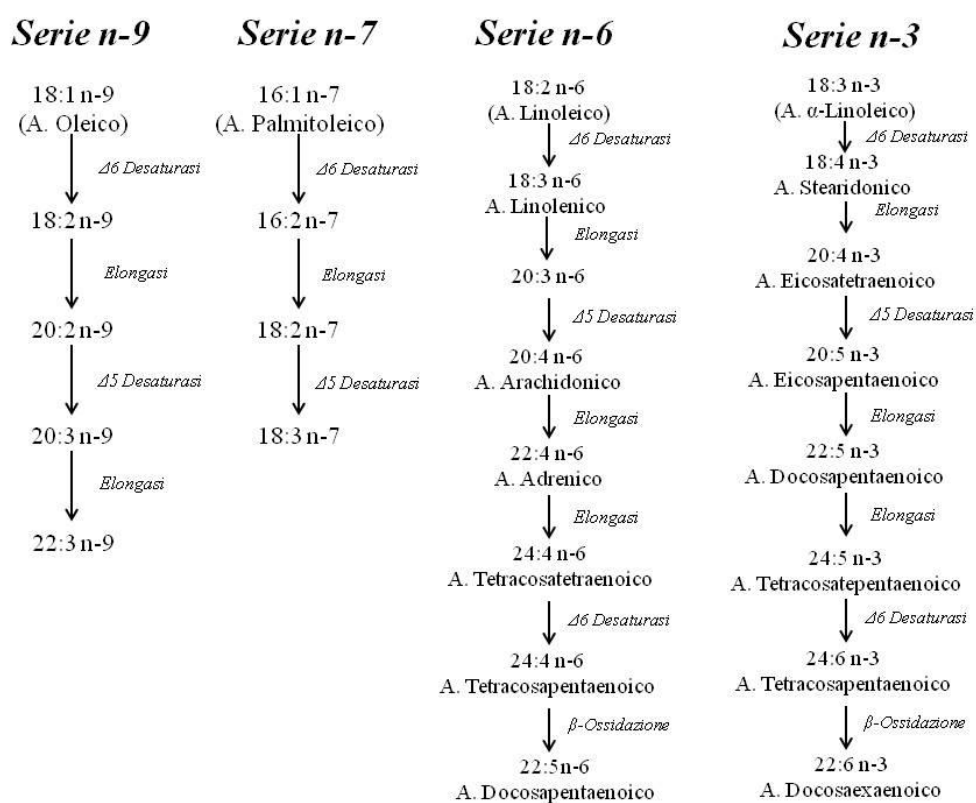


Figura 45. Rappresentazione schematica della via metabolica degli acidi grassi della serie n-9, n-7, n-6 ed n-3.

Conclusioni

I risultati emersi nell'*esperimento 1* mostrano un'alterazione genetica ed epigenetica del sistema endocannabinoide nelle ratte sottoposte al modello di AN "activity-based anorexia".

Le analisi effettuate in questo studio mettono in evidenza, per la prima volta, che la restrizione alimentare in combinazione con l'attività fisica, sono in grado di alterare geneticamente questo sistema, fondamentale sia negli aspetti edonici che fisiologici del comportamento alimentare. Pertanto, l'ambiente, e non una predisposizione genetica, costituisce un fattore determinante nell'instaurarsi delle modificazioni geniche a carico del sistema endocannabinoide nelle ratte ABA.

Le alterazioni dopaminergiche riscontrate nelle ratte ABA durante le analisi effettuate nell'*esperimento 2*, focalizzano la nostra attenzione su un aspetto molto importante della patologia, il piacere dato dalla deprivazione di cibo in combinazione con l'intensa attività fisica, fattore chiave nell'insorgenza e nel protrarsi della patologia.

I risultati dell'*esperimento 3* mettono in evidenza che il perdurare dello stato di malnutrizione dovuto all'esposizione delle ratte ad un modello cronico ABA, per la prima volta messo appunto nel nostro laboratorio, porta ad una grave alterazione dei livelli plasmatici di alcuni fra i più importanti acidi grassi, confermando dati presenti in letteratura riguardanti analisi effettuate su pazienti anoressiche. In accordo con le numerose funzioni che gli acidi grassi ricoprono, queste variazioni potrebbero concorrere nell'insorgenza delle numerose comorbidità associate all'AN.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che i sistemi endocannabinoide e dopaminergico, e i mediatori lipidici analizzati risultano profondamente alterati nelle ratte esposte al modello ABA utilizzato in tutte le fasi sperimentali. Pertanto, sulla base di queste evidenze, possiamo affermare che le alterazioni a carico di questi sistemi biologici possano dare ragione della complessità di questa patologia e della conseguente difficoltà nel trovare un approccio terapeutico univoco. I nostri risultati aiutano a comprendere che tali sistemi potrebbero nell'insieme, rappresentare dei validi target farmacologici per un'azione terapeutica nella prevenzione e/o nella cura dell'AN.

Lista delle abbreviazioni

2AG	2-arachidonoil-glicerolo
5HT	5-idrossitriptamina
AA	acido arachidonico
<i>aABA</i>	acute ABA
ABA	activity-based anorexia
AEA	N-arachidonoil-etanolamina
ALA	acido α -linoleico
AMY	amigdala
AN	anoressia nervosa
BL	baseline
<i>cABA</i>	chronic ABA
Cpu	Caudato Putamen
DA	dopamina
DOPAC	acido 3,4-Dihydroxyphenylacetico
EFA	acidi grassi essenziali
EPA	acido eicosapentaenoico
FA	acidi grassi liberi
HIAA	acido indoloacetico
HIPP	ippocampo
HVA	acido omovanillico
Hyp	ipotalamo

LA	acido linoleico
NAcc	Nucleus Accumbens
PUFA	acidi grassi polinsaturi
<i>R-aABA</i>	Recovery from acute ABA
<i>R-cABA</i>	Recovery from chronic ABA
SFA	acidi grassi saturi
VAT	tessuto adipose viscerale

5 Bibliografia

Aardema, F., O'Connor, K., 2007. The Menace Within: Obsessions and the Self. *Journal of Cognitive Psychotherapy* 21, 182–197.

Abizaid, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z.B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Sleeman, M.W., Picciotto, M.R., Tschöp, M.H., Gao, X.-B., Horvath, T.L., 2006. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* 116, 3229–3239.

Adams, B.B., 2002. Exercise-induced anaphylaxis in a marathon runner. *International Journal of Dermatology* 41, 394–396.

Aigner, M., Treasure, J., Kaye, W., Kasper, S., WFSBP Task Force On Eating Disorders, 2011. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the pharmacological treatment of eating disorders. *World J. Biol. Psychiatry* 12, 400–443.

Altirriba, J., Poher, A.-L., Rohner-Jeanrenaud, F., 2015. Chronic Oxytocin Administration as a Treatment Against Impaired Leptin Signaling or Leptin Resistance in Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 119.

Alvarez-Crespo, M., Skibicka, K.P., Farkas, I., Molnár, C.S., Egecioglu, E., Hrabovszky, E., Liposits, Z., Dickson, S.L., 2012. The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. *PLoS ONE* 7, e46321.

Alvheim, A.R., Malde, M.K., Osei-Hyiaman, D., Hong, Y.H., Pawlosky, R.J., Madsen, L., Kristiansen, K., Frøyland, L., Hibbeln, J.R., 2012. Dietary Linoleic Acid Elevates Endogenous 2-AG and Anandamide and Induces Obesity. *Obesity* 20, 1984–1994.

American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th edition.

Andries A., Frystyk J., Flyvbjerg A., Støving R.K. 2014. Dronabinol in severe, enduring anorexia nervosa: a randomized controlled trial. *Int J Eat Disord.* 47(1):18-23.

Andries A., Gram B., Støving R.K. 2015. Effect of dronabinol therapy on physical activity in anorexia nervosa: a randomised, controlled trial. *Eat Weight Disord ST.* 20:13-21.

Anier, K., Zharkovsky, A., Kalda, A., 2013. S-adenosylmethionine modifies cocaine-induced DNA methylation and increases locomotor sensitization in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 2053–2066.

- Appel, L.J., Miller, E.R., Seidler, A.J., Whelton, P.K., 1993. Does Supplementation of Diet With “Fish Oil” Reduce Blood Pressure?: A Meta-analysis of Controlled Clinical Trials. *Arch Intern Med* 153, 1429–1438.
- Aravich, P.F., Rieg, T.S., Lauterio, T.J., Doerries, L.E., 1993. Beta-endorphin and dynorphin abnormalities in rats subjected to exercise and restricted feeding: relationship to anorexia nervosa? *Brain Res.* 622, 1–8.
- Arcelus, J., Mitchell, A.J., Wales, J., Nielsen, S., 2011. Mortality rates in patients with anorexia nervosa and other eating disorders. A meta-analysis of 36 studies. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 724–731.
- Ardis, T., Cahir, M., Elliott, J., Bell, R., Reynolds, G., Cooper, S., 2009. Effect of acute tryptophan depletion on noradrenaline and dopamine in the rat brain. *J Psychopharmacol* 23, 51–55.
- Arents, G., Moudrianakis, E.N., 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11170–11174.
- Arora, S., Anubhuti, null, 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides* 40, 375–401.
- Artmann, A., Petersen, G., Hellgren, L.I., Boberg, J., Skonberg, C., Nellesmann, C., Hansen, S.H., Hansen, H.S., 2008. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781, 200–212.
- Avena, N.M., Bocarsly, M.E., Rada, P., Kim, A., Hoebel, B.G., 2008a. After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior* 94, 309–315.
- Avena, N.M., Rada, P., Hoebel, B.G., 2008b. Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32, 20–39.
- Aviello, G., Matias, I., Capasso, R., Petrosino, S., Borrelli, F., Orlando, P., Romano, B., Capasso, F., Marzo, V.D., Izzo, A.A., 2008. Inhibitory effect of the anorexic compound oleoylethanolamide on gastric emptying in control and overweight mice. *J Mol Med* 86, 413–422.
- Avraham, Y., Paturski, I., Magen, I., Vorobiev, L., Berry, E.M., 2017. 2-Arachidonoylglycerol as a possible treatment for anorexia nervosa in animal model in mice. *Brain Res.* 1670, 185–190.
- Bachrach, L.K., Katzman, D.K., Litt, I.F., Guido, D., Marcus, R., 1991. Recovery from osteopenia in adolescent girls with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 602–606.

Baer, D.J., Judd, J.T., Clevidence, B.A., Tracy, R.P., 2004. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 79, 969–973.

Baker-Andresen, D., Zhao, Q., Li, X., Jupp, B., Chesworth, R., Lawrence, A.J., Bredy, T., 2015. Persistent variations in neuronal DNA methylation following cocaine self-administration and protracted abstinence in mice. *Neuroepigenetics* 4, 1–11.

Bakhtazad, A., Vouseoghi, N., Garmabi, B., Zarrindast, M.R., 2016. Evaluation of CART peptide level in rat plasma and CSF: Possible role as a biomarker in opioid addiction. *Peptides* 84, 1–6.

Balfour, D.J.K., 2004. The neurobiology of tobacco dependence: A preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus. *Nicotine Tob Res* 6, 899–912.

Balk, E., Chung, M., Lichtenstein, A., Chew, P., Kupelnick, B., Lawrence, A., DeVine, D., Lau, J., 2004. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors and intermediate markers of cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 1–6.

Balvers, M.G.J., Verhoeckx, K.C.M., Plastina, P., Wortelboer, H.M., Meijerink, J., Witkamp, R.F., 2010. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid are converted by 3T3-L1 adipocytes to N-acyl ethanolamines with anti-inflammatory properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801, 1107–1114.

Banni S., Contini M.S., Angioni E., Deiana M., Dessì M.A., Melis M.P., Carta G., Corongiu F.P. 1996. A novel approach to study linoleic acid autoxidation: importance of simultaneous detection of the substrate and its derivative oxidation products. *Free Radic Res.* 25(1):43-53.

Banni, S., Carta, G., Murru, E., Cordeddu, L., Giordano, E., Sirigu, A.R., Berge, K., Vik, H., Maki, K.C., Di Marzo, V., Griinari, M., 2011. Krill oil significantly decreases 2-arachidonoylglycerol plasma levels in obese subjects. *Nutrition & Metabolism* 8, 7.

Barbano, M.F., Cador, M., 2006. Differential Regulation of the Consummatory, Motivational and Anticipatory Aspects of Feeding Behavior by Dopaminergic and Opioidergic Drugs. *Neuropsychopharmacology* 31, 1371–1381.

Barbarich, N.C., Kaye, W.H., Jimerson, D., 2003. Neurotransmitter and imaging studies in anorexia nervosa: new targets for treatment. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2, 61–72.

Barros V.G., Berger M.A., Martijena I.D., Sarchi M.I., Pérez A.A., Molina V.A., Tarazi F.I., Antonelli M.C. 2004. Early adoption modifies the effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. *J Neurosci Res.* 76(4):488-96.

- Barrot, M., Olivier, J.D.A., Perrotti, L.I., DiLeone, R.J., Berton, O., Eisch, A.J., Impey, S., Storm, D.R., Neve, R.L., Yin, J.C., Zachariou, V., Nestler, E.J., 2002. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *PNAS* 99, 11435–11440.
- Baskin, D.G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., Schwartz, M.W., 1999. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 848, 114–123.
- Bassareo, V., De Luca, M.A., Di Chiara, G., 2002. Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 22, 4709–4719.
- Batetta, B., Griinari, M., Carta, G., Murru, E., Ligresti, A., Cordeddu, L., Giordano, E., Sanna, F., Bisogno, T., Uda, S., Collu, M., Bruheim, I., Di Marzo, V., Banni, S., 2009. Endocannabinoids May Mediate the Ability of (n-3) Fatty Acids to Reduce Ectopic Fat and Inflammatory Mediators in Obese Zucker Rats. *J Nutr* 139, 1495–1501.
- Batterham, R.L., Bloom, S.R., 2003. The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994, 162–168.
- Baver, S.B., Hope, K., Guyot, S., Bjørbaek, C., Kaczorowski, C., O’Connell, K.M.S., 2014. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 34, 5486–5496.
- Beal, J.E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J.O., Bellman, P., Yangco, B., Lefkowitz, L., Plasse, T.F., Shepard, K.V., 1995. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10, 89–97.
- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217.
- Bélanger, S.A., Vanasse, M., Spahis, S., Sylvestre, M.-P., Lippé, S., l’Heureux, F., Ghadirian, P., Vanasse, C.-M., Levy, E., 2009. Omega-3 fatty acid treatment of children with attention-deficit hyperactivity disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Paediatr Child Health* 14, 89–98.
- Bellocchio, L., Lafenêtre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., Chaouloff, F., Piazza, P.V., Marsicano, G., 2010. Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* 13, 281–283.
- Bennetzen, M.F., 2011. Investigations of the endocannabinoid system in adipose tissue: effects of obesity/ weight loss and treatment options. *Dan Med Bull* 58, B4269.
- Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412.
- Bergh, C., Södersten, P., 1996. Anorexia nervosa, self-starvation and the reward of stress. *Nat. Med.* 2, 21–22.

- Bergstrom, H.C., Pinard, C.R., 2017. Corticolimbic circuits in learning, memory, and disease. *J. Neurosci. Res.* 95, 795–796.
- Bermudez, B., Lopez, S., Ortega, A., Varela, L.M., Pacheco, Y.M., Abia, R., Muriana, F.J.G., 2011. Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr. Pharm. Des.* 17, 831–843.
- Berner, L.A., Winter, S.R., Matheson, B.E., Benson, L., Lowe, M.R., 2017. Behind binge eating: A review of food-specific adaptations of neurocognitive and neuroimaging tasks. *Physiol. Behav.* 176, 59–70.
- Berridge, K.C., 2012. From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation. *Eur J Neurosci* 35, 1124–1143.
- Berridge, K.C., Kringelbach, M.L., 2015. Pleasure Systems in the Brain. *Neuron* 86, 646–664.
- Berthoud, H.-R., 2006. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, 197S–200S.
- Bestor, T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395–2402.
- Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillon, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2005. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J.* 19, 1680–1682.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., Di Marzo, V., 1999. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 377–380.
- Blauwhoff-Buskermolen, S., Langius, J.A.E., Heijboer, A.C., Becker, A., de van der Schueren, M.A.E., Verheul, H.M.W., 2017. Plasma Ghrelin Levels Are Associated with Anorexia but Not Cachexia in Patients with NSCLC. *Front Physiol* 8, 119.
- Blevins, J.E., Baskin, D.G., 2015. Translational and therapeutic potential of oxytocin as an anti-obesity strategy: Insights from rodents, nonhuman primates and humans. *Physiol. Behav.* 152, 438–449.
- Blinder, B.J., Cumella, E.J., Sanathara, V.A., 2006. Psychiatric comorbidities of female inpatients with eating disorders. *Psychosom Med* 68, 454–462.
- Blundell, J.E., 1986. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. *Appetite* 7, 39–56.

- Blundell, J.E., Goodson, S., Halford, J.C., 2001. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25 Suppl 1, S29-34.
- Booij L., Casey K.F., Antunes J.M., Szyf M., Joobor R., Israël M., Steiger H., 2015. DNA methylation in individuals with anorexia nervosa and in matched normal-eater controls: A genome-wide study. *Int J Eat Disord.* 48(7):874-82.
- Borghjod, S., Feinman, R.D., 2012. Response of C57Bl/6 mice to a carbohydrate-free diet. *Nutr Metab (Lond)* 9, 69.
- Borgland, S.L., Taha, S.A., Sarti, F., Fields, H.L., Bonci, A., 2006. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49, 589–601.
- Bouwknicht, J.A., van der Gugten, J., Hijzen, T.H., Maes, R.A.A., Hen, R., Olivier, B., 2001. Male and female 5-HT1B receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiology & Behavior* 74, 507–516.
- Bowers, M.B., Mazure, C.M., Greenfield, D.G., 1994. Elevated plasma monoamine metabolites in eating disorders. *Psychiatry Research* 52, 11–15.
- Bratland-Sanda, S., Sundgot-Borgen, J., Rø, Ø., Rosenvinge, J.H., Hoffart, A., Martinsen, E.W., n.d. “I’m not physically active - I only go for walks”: Physical activity in patients with longstanding eating disorders. *International Journal of Eating Disorders* 43, 88–92.
- Breivogel, C.S., Childers, S.R., 1998. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol. Dis.* 5, 417–431.
- Brenner, R.R., 2003. Hormonal modulation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68, 151–162.
- Brewerton, T.D., 1992. Serotonin function in depression: effects of seasonality? *Am J Psychiatry* 149, 1277.
- Brewerton, T.D., 2012. Antipsychotic agents in the treatment of anorexia nervosa: neuropsychopharmacologic rationale and evidence from controlled trials. *Curr Psychiatry Rep* 14, 398–405.
- Brightman, M.W., Broadwell, R.D., 1976. The morphological approach to the study of normal and abnormal brain permeability. *Adv. Exp. Med. Biol.* 69, 41–54.
- Brito, N.A., Brito, M.N., Bartness, T.J., 2008. Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, R1445–R1452.

- Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A., Bonci, A., 2012. Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron* 76, 790–803.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T., 1998. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15043–15048.
- Broft, A., Slifstein, M., Osborne, J., Kothari, P., Morim, S., Shingleton, R., Kenney, L., Vallabhajosula, S., Attia, E., Martinez, D., Timothy Walsh, B., 2015. Striatal dopamine type 2 receptor availability in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 233, 380–387.
- Broocks, A., Liu, J., Pirke, K.M., 1990. Semistarvation-induced hyperactivity compensates for decreased norepinephrine and dopamine turnover in the mediobasal hypothalamus of the rat. *J. Neural Transmission* 79, 113–124.
- Browne, C.A., Clarke, G., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2012. An effective dietary method for chronic tryptophan depletion in two mouse strains illuminates a role for 5-HT in nesting behaviour. *Neuropharmacology* 62, 1903–1915.
- Bruss, M.D., Khambatta, C.F., Ruby, M.A., Aggarwal, I., Hellerstein, M.K., 2010. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E108-116.
- Bulik, C.M., Sullivan, P.F., Tozzi, F., Furberg, H., Lichtenstein, P., Pedersen, N.L., 2006. Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 305–312.
- Burgalassi, A., Ramacciotti, C.E., Bianchi, M., Coli, E., Polese, L., Bondi, E., Massimetti, G., Dell'osso, L., 2009. Caffeine consumption among eating disorder patients: epidemiology, motivations, and potential of abuse. *Eat Weight Disord* 14, e212-218.
- Burr, G.O., Burr, M.M., 1929. A New Deficiency Disease Produced by the Rigid Exclusion of Fat from the Diet. *J. Biol. Chem.* 82, 345–367.
- Burr, G.O., Burr, M.M., 1981. On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Progress in Lipid Research* 20, xxi.
- Busquets Garcia, A., Soria-Gomez, E., Bellocchio, L., Marsicano, G., 2016. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *F1000Res* 5.
- Cabral, A., López Soto, E.J., Epelbaum, J., Perelló, M., 2017. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *Int J Mol Sci* 18.

- Cabral, A., Valdivia, S., Reynaldo, M., Cyr, N.E., Nillni, E.A., Perello, M., 2012. Short-term cold exposure activates TRH neurons exclusively in the hypothalamic paraventricular nucleus and raphe pallidus. *Neuroscience Letters* 518, 86–91.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Di Filippo, M., 2007. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences, Fifty years of dopamine research* 30, 211–219.
- Calder, P.C., 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 142, 592S-599S.
- Calder, P.C., 2014. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116, 1280–1300.
- Calder, P.C., 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 39, 18S-32S.
- Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394, 277–281.
- Cani, P.D., Montoya, M.L., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Lambert, D.M., 2004. Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br. J. Nutr.* 92, 757–761.
- Cardinal, P., Bellocchio, L., Clark, S., Cannich, A., Klugmann, M., Lutz, B., Marsicano, G., Cota, D., 2012. Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology* 153, 4136–4143.
- Caregaro, L., Di Pascoli, L., Favaro, A., Nardi, M., Santonastaso, P., 2005. Sodium depletion and hemoconcentration: overlooked complications in patients with anorexia nervosa? *Nutrition* 21, 438–445.
- Carlson J.N., Herrick K.F., Baird J.L., Glick S.D. 1987. Selective enhancement of dopamine utilization in the rat prefrontal cortex by food deprivation. *Brain Res.* 400(1):200-3.
- Carlson, J.N., Herrick, K.F., Baird, J.L., Glick, S.D., 1987. Selective enhancement of dopamine utilization in the rat prefrontal cortex by food deprivation. *Brain Research* 400, 200–203.
- Carrera, O., Adan, R.A.H., Gutierrez, E., Danner, U.N., Hoek, H.W., Elburg, A.A. van, Kas, M.J.H., 2012. Hyperactivity in Anorexia Nervosa: Warming Up Not Just Burning-Off Calories. *PLOS ONE* 7, e41851.
- Carrier, E.J., Patel, S., Hillard, C.J., 2005. Endocannabinoids in neuroimmunology and stress. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 657–665.

- Carter, J.A., Duncan, P.A., 1984. Binge-eating and vomiting: A survey of a high school population. *Psychol. Schs.* 21, 198–203.
- Carter, J.C., Blackmore, E., Sutandar-Pinnock, K., Woodside, D.B., 2004. Relapse in anorexia nervosa: a survival analysis. *Psychol Med* 34, 671–679.
- Caspar-Bauguil, S., Montastier, E., Galinon, F., Frisch-Benarous, D., Salvayre, R., Ritz, P., 2012. Anorexia nervosa patients display a deficit in membrane long chain polyunsaturated fatty acids. *Clinical Nutrition* 31, 386–390.
- Casper, R.C., Sullivan, E.L., Tecott, L., 2008. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology (Berl.)* 199, 313–329.
- Casteels, C., Gérard, N., van Kuyck, K., Pottel, L., Nuttin, B., Bormans, G., Van Laere, K., 2014. Small animal PET imaging of the type 1 cannabinoid receptor in a rodent model for anorexia nervosa. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 41, 308–321.
- Chaouloff, F., n.d. Physical exercise and brain monoamines: a review. *Acta Physiologica Scandinavica* 137, 1–13.
- Chesler, B.E., 1995. The impact of stress, fear of fatness, and panic disorder with agoraphobia on eating disorder symptomatology: a case study. *Int J Eat Disord* 18, 195–198.
- Chial, H.J., McAlpine, D.E., Camilleri, M., 2002. Anorexia nervosa: manifestations and management for the gastroenterologist. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 255–269.
- Chiara, G.D., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *PNAS* 85, 5274–5278.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C., Kunugi, H., 2012. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 39, 112–119.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1, 581–585.
- Cinti S. 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73(1):9-15.
- Clausen, L., 2008. Time to remission for eating disorder patients: A 2½-year follow-up study of outcome and predictors. *Nordic Journal of Psychiatry* 62, 151–159.

- Cluny, N.L., Reimer, R.A., Sharkey, K.A., 2012. Cannabinoid signalling regulates inflammation and energy balance: the importance of the brain-gut axis. *Brain Behav. Immun.* 26, 691–698.
- Collu R., Scherma M., Piscitelli F., Giunti E., Satta V., Castelli M.P., Verde R., Usai P., Bisogno T., Fratta W., Fadda P. 2019. Impaired brain endocannabinoid tone in the activity-based model of anorexia nervosa (*Submitted*).
- Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R., Gessa, G.L., 1998. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 63, PL113-117.
- Considine, R.V., 2005. Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med* 5, 15–24.
- Cornejo, M.P., Hentges, S.T., Maliqueo, M., Coirini, H., Becu-Villalobos, D., Elias, C.F., 2016. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. *J. Neuroendocrinol.* 28.
- Cota, D., 2008. Role of the endocannabinoid system in energy balance regulation and obesity. *Front Horm Res* 36, 135–145.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A.C.E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G.K., Pagotto, U., 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 112, 423–431.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661.
- Crawford, M.A., Casperd, N.M., Sinclair, A.J., 1976. The long chain metabolites of linoleic and linolenic acids in liver and brain in herbivores and carnivores. *Comp. Biochem. Physiol., B* 54, 395–401.
- Crider, K.S., Yang, T.P., Berry, R.J., Bailey, L.B., 2012. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr* 3, 21–38.
- Crozier, W.R., Alden, L.E., 2005. *The Essential Handbook of Social Anxiety for Clinicians.* John Wiley & Sons.
- Cuntz, U., Enck, P., Frühauf, E., Lehnert, P., Riepl, R.L., Fichter, M.M., Otto, B., 2013. Cholecystokinin revisited: CCK and the hunger trap in anorexia nervosa. *PLoS ONE* 8, e54457.

- Curb, J.D., Wergowske, G., Dobbs, J.C., Abbott, R.D., Huang, B., 2000. Serum lipid effects of a high-monounsaturated fat diet based on macadamia nuts. *Arch. Intern. Med.* 160, 1154–1158.
- Czernichow, S., Thomas, D., Bruckert, E., 2010. n-6 Fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. *Br. J. Nutr.* 104, 788–796.
- D’Addario, C., Micioni Di Bonaventura, M.V., Pucci, M., Romano, A., Gaetani, S., Ciccocioppo, R., Cifani, C., Maccarrone, M., 2014. Endocannabinoid signaling and food addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 47, 203–224.
- D’Andrea, G., Ostuzzi, R., Francesconi, F., Musco, F., Bolner, A., d’Onofrio, F., Colavito, D., 2009. Migraine prevalence in eating disorders and pathophysiological correlations. *Neurol Sci* 30, 55.
- D’Angio, M., Scatton, B., 1989. Feeding or exposure to food odors increases extracellular DOPAC levels (as measured by in vivo voltammetry) in the prefrontal cortex of food-deprived rats. *Neurosci. Lett.* 96, 223–228.
- Dash, S., Xiao, C., Morgantini, C., Lewis, G.F., 2015. New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annual Review of Nutrition* 35, 265–294.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M., 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 4255–4261.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., Mena-Segovia, J., 2014. A Major External Source of Cholinergic Innervation of the Striatum and Nucleus Accumbens Originates in the Brainstem. *J Neurosci* 34, 4509–4518.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., Richmond, T.J., 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113.
- Davis, C., Kennedy, S.H., Ralevski, E., Dionne, M., Brewer, H., Neitzert, C., Ratusny, D., 1995. Obsessive compulsiveness and physical activity in anorexia nervosa and high-level exercising. *Journal of Psychosomatic Research* 39, 967–976.
- Davis, C., Kennedy, S.H., Ravelski, E., Dionne, M., 1994. The role of physical activity in the development and maintenance of eating disorders. *Psychological Medicine* 24, 957–967.
- Day, J.J., Sweatt, J.D., 2010. DNA methylation and memory formation. *Nat. Neurosci.* 13, 1319–1323.

- de Kloet, A.D., Woods, S.C., 2009. Minireview: Endocannabinoids and their receptors as targets for obesity therapy. *Endocrinology* 150, 2531–2536.
- de Lago, E., Petrosino, S., Valenti, M., Morera, E., Ortega-Gutierrez, S., Fernandez-Ruiz, J., Di Marzo, V., 2005. Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. *Biochem. Pharmacol.* 70, 446–452.
- De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., Borrelli, E., 2009. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9, 53–58.
- De Vry, J., Schreiber, R., Eckel, G., Jentsch, K.R., 2004. Behavioral mechanisms underlying inhibition of food-maintained responding by the cannabinoid receptor antagonist/inverse agonist SR141716A. *European Journal of Pharmacology* 483, 55–63
- Deckelbaum, R.J., Worgall, T.S., Seo, T., 2006. n-3 fatty acids and gene expression. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1520S-1525S.
- DeGuzman, M., Shott, M.E., Yang, T.T., Riederer, J., Frank, G.K.W., 2017. Association of Elevated Reward Prediction Error Response With Weight Gain in Adolescent Anorexia Nervosa. *Am J Psychiatry* 174, 557–565.
- Demuth, D.G., Molleman, A., 2006. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 78, 549–563.
- den Boon, F.S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., Kruse, C.G., Maccarrone, M., Wadman, W.J., Werkman, T.R., 2012. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3534–3539.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., 2007. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7, 69–76.
- Di Marzo, V., 2009. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol. Res.* 60, 77–84.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., 2012. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367, 3216–3228.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686–691.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., Kunos, G., 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825.

- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., Kunos, G., 2001a. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825.
- Di Marzo, V., Griinari, M., Carta, G., Murru, E., Ligresti, A., Cordeddu, L., Giordano, E., Bisogno, T., Collu, M., Batetta, B., Uda, S., Berge, K., Banni, S., 2010. Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. *International Dairy Journal, US/Ireland Functional Foods Conference* 20, 231–235.
- Di Marzo, V., Matias, I., 2005. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 8, 585–589.
- Diep, T.A., Madsen, A.N., Holst, B., Kristiansen, M.M., Wellner, N., Hansen, S.H., Hansen, H.S., 2010. Dietary fat decreases intestinal levels of the anorectic lipids through a fat sensor. *The FASEB Journal* 25, 765–774.
- DiPatrizio, N.V., Astarita, G., Schwartz, G., Li, X., Piomelli, D., 2011. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *PNAS* 108, 12904–12908.
- Dixon D.P., Ackert A.M., Eckel L.A. 2003. Development of, and recovery from, activity-based anorexia in female rats. *Physiol Behav.* 80(2-3):273-9.
- Domingos, A.I., Vaynshteyn, J., Voss, H.U., Ren, X., Gradinaru, V., Zang, F., Deisseroth, K., Araujo, I.E. de, Friedman, J., 2011. Leptin regulates the reward value of nutrient. *Nature Neuroscience* 14, 1562–1568.
- Dossat, A.M., Diaz, R., Gallo, L., Panagos, A., Kay, K., Williams, D.L., 2013. Nucleus accumbens GLP-1 receptors influence meal size and palatability. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 304, E1314–E1320.
- Dossat, A.M., Lilly, N., Kay, K., Williams, D.L., 2011. Glucagon-Like Peptide 1 Receptors in Nucleus Accumbens Affect Food Intake. *J. Neurosci.* 31, 14453–14457.
- Drewnowski, A., 1997. Why do we Like Fat? *Journal of the American Dietetic Association* 97, S58–S62.
- Drewnowski, A., Pierce, B., Halmi, K.A., 1988. Fat aversion in eating disorders. *Appetite* 10, 119–131.
- Duclos, M., Bouchet, M., Vettier, A., Richard, D., n.d. Genetic Differences in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and Food Restriction-induced Hyperactivity in Three Inbred Strains of Rats. *Journal of Neuroendocrinology* 17, 740–752.
- Eaton, K., Sallee, F.R., Sah, R., 2007. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. *Curr Top Med Chem* 7, 1645–1659.

Eddy, K.T., Lawson, E.A., Meade, C., Meenaghan, E., Horton, S.E., Misra, M., Klibanski, A., Miller, K.K., 2015. Appetite regulatory hormones in women with anorexia nervosa: binge-eating/purging versus restricting type. *J Clin Psychiatry* 76, 19–24.

Ehrlich, S., Weiss, D., Burghardt, R., Infante-Duarte, C., Brockhaus, S., Muschler, M.A., Bleich, S., Lehmkuhl, U., Frieling, H., 2010. Promoter specific DNA methylation and gene expression of POMC in acutely underweight and recovered patients with anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 44, 827–833.

Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., Elmquist, J.K., 1998. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375–1385.

Emilio, G., María, C., Olaia, C., Reyes, V., 2008. Heat reversal of activity-based anorexia: Implications for the treatment of anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders* 41, 594–601.

ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., Thurman, R.E., Kuehn, M.S., Taylor, C.M., Neph, S., Koch, C.M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J.A., Andrews, R.M., Flicek, P., Boyle, P.J., Cao, H., Carter, N.P., Clelland, G.K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S.C., Dorschner, M.O., Fiegler, H., Giresi, P.G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K.D., Johnson, B.E., Johnson, E.M., Frum, T.T., Rosenzweig, E.R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G.C., Navas, P.A., Neri, F., Parker, S.C.J., Sabo, P.J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetrie, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F.S., Dekker, J., Lieb, J.D., Tullius, T.D., Crawford, G.E., Sunyaev, S., Noble, W.S., Dunham, I., Denoeud, F., Reymond, A., Kapranov, P., Rozowsky, J., Zheng, D., Castelo, R., Frankish, A., Harrow, J., Ghosh, S., Sandelin, A., Hofacker, I.L., Baertsch, R., Keefe, D., Dike, S., Cheng, J., Hirsch, H.A., Sekinger, E.A., Lagarde, J., Abril, J.F., Shahab, A., Flamm, C., Fried, C., Hackermüller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Tanzer, A., Washietl, S., Korbel, J., Emanuelsson, O., Pedersen, J.S., Holroyd, N., Taylor, R., Swarbreck, D., Matthews, N., Dickson, M.C., Thomas, D.J., Weirauch, M.T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K.G., Sung, W.-K., Ooi, H.S., Chiu, K.P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M.L., Valencia, A., Choo, S.W., Choo, C.Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T.G., Brown, J.B., Ganesh, M., Patel, S., Tammana, H., Chrast, J., Henriksen, C.N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, Xueqing, Bickel, P., Mattick, J.S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R.M., Rogers, J., Stadler, P.F., Lowe, T.M., Wei, C.-L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S.E., Fu, Y., Green, E.D., Karaöz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L.A., Wetterstrand, K.A., Good, P.J., Feingold, E.A., Guyer, M.S., Cooper, G.M., Asimenos, G., Dewey, C.N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J.I., Löytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N.R., Holmes, I., Mullikin, J.C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Seringhaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W.J., Stone, E.A., NISC Comparative Sequencing Program, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, Washington University Genome

Sequencing Center, Broad Institute, Children's Hospital Oakland Research Institute, Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R.C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N.D., Zhang, Z.D., Barrera, L., Stuart, R., King, D.C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M.C., Kim, J., Bhinge, A.A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V.B., Lee, C.W.H., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M.J., Inman, D., Singer, M.A., Richmond, T.A., Munn, K.J., Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J.C., Couttet, P., Bruce, A.W., Dovey, O.M., Ellis, P.D., Langford, C.F., Nix, D.A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A.E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T.H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Aldred, S.F., Cooper, S.J., Halees, A., Lin, J.M., Shulha, H.P., Zhang, Xiaoling, Xu, M., Haidar, J.N.S., Yu, Y., Ruan, Y., Iyer, V.R., Green, R.D., Wadelius, C., Farnham, P.J., Ren, B., Harte, R.A., Hinrichs, A.S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A.S., Smith, K., Thakkapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R.M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C.P., de Bakker, P.I.W., Kern, A.D., Lopez-Bigas, N., Martin, J.D., Stranger, B.E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyraas, E., Hallgrímsdóttir, I.B., Huppert, J., Zody, M.C., Abecasis, G.R., Estivill, X., Bouffard, G.G., Guan, X., Hansen, N.F., Idol, J.R., Maduro, V.V.B., Maskeri, B., McDowell, J.C., Park, M., Thomas, P.J., Young, A.C., Blakesley, R.W., Muzny, D.M., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Worley, K.C., Jiang, H., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D.B., Chang, J.L., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B., de Jong, P.J., 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816.

Engeli, S., Heusser, K., Janke, J., Gorzelniak, K., Bátkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F.C., Jordan, J., 2008. Peripheral endocannabinoid system activity in patients treated with sibutramine. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1135–1137.

Esteller, M., 2008. Epigenetics in evolution and disease. *The Lancet* 372, S90–S96.

Estour, B., Germain, N., Diconne, E., Frere, D., Cottet-Emard, J.-M., Carrot, G., Lang, F., Galusca, B., 2010. Hormonal Profile Heterogeneity and Short-Term Physical Risk in Restrictive Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 2203–2210.

Exner, C., Hebebrand, J., Remschmidt, H., Wewetzer, C., Ziegler, A., Herpertz, S., Schweiger, U., Blum, W.F., Preibisch, G., Heldmaier, G., Klingenspor, M., 2000. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry* 5, 476–481.

Fadda P., Zaplatic E., Giunti E., Pucci M., Micioni Di Bonaventura M.V., Scherma M., Maccarrone M., Nilsson I A.K., Cifani C., D'Addario C. 2018. Epigenetic regulation of the endocannabinoid system in the activity-based rat model of anorexia nervosa (*Submitted*).

Fadel, J., Deutch, A.Y., 2002. Anatomical substrates of orexin–dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111, 379–387.

- Fauzi, M., Leshan, R., Björnholm, M., Hennessey, T., Jones, J., Münzberg, H., 2007. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology* 148, 5414–5423.
- Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., O’Rahilly, S., 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 879–884.
- Feinberg, A.P., Tycko, B., 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* 4, 143–153.
- Fekete, C., Zséli, G., Singru, P.S., Kádár, A., Wittmann, G., Füzesi, T., El-Bermani, W., Lechan, R.M., 2012. Activation of anorexigenic pro-opiomelanocortin neurones during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs. *J. Neuroendocrinol.* 24, 1423–1431.
- Ferreira, A., Lamarque, S., Boyer, P., Perez-Diaz, F., Jouvent, R., Cohen-Salmon, C., 2006. Spontaneous appetite for wheel-running: a model of dependency on physical activity in rat. *European Psychiatry* 21, 580–588.
- Feurté, S., Nicolaidis, S., Berridge, K.C., 2000. Conditioned taste aversion in rats for a threonine-deficient diet: demonstration by the taste reactivity test. *Physiology & Behavior* 68, 423–429.
- Fichter, M.M., Quadflieg, N., Hedlund, S., 2006. Twelve-year course and outcome predictors of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 39, 87–100.
- Field, A.E., Sonneville, K.R., Micali, N., Crosby, R.D., Swanson, S.A., Laird, N.M., Treasure, J., Solmi, F., Horton, N.J., 2012. Prospective association of common eating disorders and adverse outcomes. *Pediatrics* 130, e289-295.
- Figlewicz, D.P., Evans, S.B., Murphy, J., Hoen, M., Baskin, D.G., 2003. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 964, 107–115.
- Figlewicz, D.P., Szot, P., Chavez, M., Woods, S.C., Veith, R.C., 1994. Intraventricular insulin increases dopamine transporter mRNA in rat VTA/substantia nigra. *Brain Res.* 644, 331–334.
- Flak, J.N., Myers, M.G., 2016. Minireview: CNS Mechanisms of Leptin Action. *Mol. Endocrinol.* 30, 3–12.
- Flament, M.F., Bissada, H., Spettigue, W., 2012. Evidence-based pharmacotherapy of eating disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 189–207.
- Flynn, M.C., Plata-Salamán, C.R., French-Mullen, J.M., 1999. Neuropeptide Y-related compounds and feeding. *Physiol. Behav.* 65, 901–905.

Föcker, M., Timmesfeld, N., Scherag, S., Bühren, K., Langkamp, M., Dempfle, A., Sheridan, E.M., de Zwaan, M., Fleischhaker, C., Herzog, W., Egberts, K., Zipfel, S., Herpertz-Dahlmann, B., Hebebrand, J., 2011. Screening for anorexia nervosa via measurement of serum leptin levels. *J Neural Transm (Vienna)* 118, 571–578.

Foerde, K., Steinglass, J.E., Shohamy, D., Walsh, B.T., 2015. Neural mechanisms supporting maladaptive food choices in anorexia nervosa. *Nature Neuroscience* 18, 1571–1573.

Folch J., Lebaron F.N. 1956. The chemistry of the phosphoinositides. *Can J Biochem Physiol.* 34(2):305-19.

Foley, T.E., Fleshner, M., 2008. Neuroplasticity of Dopamine Circuits After Exercise: Implications for Central Fatigue. *Neuromol Med* 10, 67–80.

Fonseca BM, Costa MA, Almada M, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. 2013. Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 102-103:13-30.

Fouladi, F., Mitchell, J.E., Crosby, R.D., Engel, S.G., Crow, S., Hill, L., Le Grange, D., Powers, P., Steffen, K.J., 2015. Prevalence of Alcohol and Other Substance Use in Patients with Eating Disorders. *Eur Eat Disord Rev* 23, 531–536.

Fox, M.T., Reynolds, G.W., Scott, I., Simcock, D.C., Simpson, H.V., 2006. Vagal and splanchnic afferent nerves are not essential for anorexia associated with abomasal parasitism in sheep. *Vet. Parasitol.* 135, 287–295.

Frank, G.K., Bailer, U.F., Henry, S.E., Drevets, W., Meltzer, C.C., Price, J.C., Mathis, C.A., Wagner, A., Hoge, J., Ziolko, S., Barbarich-Marsteller, N., Weissfeld, L., Kaye, W.H., 2005. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Biol. Psychiatry* 58, 908–912.

Frank, G.K.W., 2014. Could dopamine agonists aid in drug development for anorexia nervosa? *Front Nutr* 1, 19.

Fride, E., Bregman, T., Kirkham, T.C., 2005. Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 230, 225–234.

Frieling, H., Albrecht, H., Jedtberg, S., Gozner, A., Lenz, B., Wilhelm, J., Hillemacher, T., de Zwaan, M., Kornhuber, J., Bleich, S., 2009. Elevated cannabinoid 1 receptor mRNA is linked to eating disorder related behavior and attitudes in females with eating disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34, 620–624.

Frieling, H., Bleich, S., Otten, J., Römer, K.D., Kornhuber, J., de Zwaan, M., Jacoby, G.E., Wilhelm, J., Hillemacher, T., 2008. Epigenetic downregulation of atrial natriuretic

peptide but not vasopressin mRNA expression in females with eating disorders is related to impulsivity. *Neuropsychopharmacology* 33, 2605–2609.

Frieling, H., Gozner, A., Römer, K.D., Lenz, B., Bönsch, D., Wilhelm, J., Hillemacher, T., Zwaan, M. de, Kornhuber, J., Bleich, S., 2007. Global DNA hypomethylation and DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in females with anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry* 12, 229–230.

Frieling, H., Römer, K.D., Scholz, S., Mittelbach, F., Wilhelm, J., De Zwaan, M., Jacoby, G.E., Kornhuber, J., Hillemacher, T., Bleich, S., 2010. Epigenetic dysregulation of dopaminergic genes in eating disorders. *Int J Eat Disord* 43, 577–583.

Frintrop, L., Trinh, S., Liesbrock, J., Paulukat, L., Kas, M.J., Tolba, R., Konrad, K., Herpertz-Dahlmann, B., Beyer, C., Seitz, J., 2018. Establishment of a chronic activity-based anorexia rat model. *J. Neurosci. Methods* 293, 191–198.

Frisch, A., Laufer, N., Danziger, Y., Michaelovsky, E., Leor, S., Carel, C., Stein, D., Fenig, S., Mimouni, M., Apter, A., Weizman, A., 2001. Association of anorexia nervosa with the high activity allele of the COMT gene: a family-based study in Israeli patients. *Molecular Psychiatry* 6, 243–245.

Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E., Piomelli, D., 2005. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology, Future Directions in Cannabinoid Therapeutics: “From the Bench to the Clinic”* 48, 1147–1153.

Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E.N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 2006. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51, 811–822.

Funahashi, H., Hori, T., Shimoda, Y., Mizushima, H., Ryushi, T., Katoh, S., Shioda, S., 2000. Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul. Pept.* 92, 31–35.

Gaetani, S., Oveisi, F., Piomelli, D., 2003. Modulation of Meal Pattern in the Rat by the Anorexic Lipid Mediator Oleoylethanolamide. *Neuropsychopharmacology* 28, 1311–1316.

Galetta, F., Franzoni, F., Prattichizzo, F., Rolla, M., Santoro, G., Pentimone, F., 2003. Heart rate variability and left ventricular diastolic function in anorexia nervosa. *J Adolesc Health* 32, 416–421.

Galusca, B., Prévost, G., Germain, N., Dubuc, I., Ling, Y., Anouar, Y., Estour, B., Chartrel, N., 2015. Neuropeptide Y and α -MSH circadian levels in two populations with low body weight: anorexia nervosa and constitutional thinness. *PLoS ONE* 10, e0122040.

Gambarana, C., Scheggi, S., Tagliamonte, A., Tolu, P., De Montis, M.G., 2001. Animal models for the study of antidepressant activity. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 7, 11–20.

Garg, M.L., Blake, R.J., Wills, R.B.H., 2003. Macadamia nut consumption lowers plasma total and LDL cholesterol levels in hypercholesterolemic men. *J. Nutr.* 133, 1060–1063.

Gasparetti A.L., Souza C. T., Pereira-da-Silva Márcio, Oliveira Rachel L. G. S., Saad Mário J. A., Carneiro Everardo M., Velloso Lício A., 2004. Cold Exposure Induces Tissue-Specific Modulation of the Insulin-Signalling Pathway in *Rattus Norvegicus*. *The Journal of Physiology* 552, 149–162.

Gauthier, C., Hassler, C., Mattar, L., Launay, J.-M., Callebert, J., Steiger, H., Melchior, J.-C., Falissard, B., Berthoz, S., Mourier-Soleillant, V., Lang, F., Delorme, M., Pommereau, X., Gerardin, P., Bioulac, S., Bouvard, M., EVHAN Group, Godart, N., 2014. Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: links with plasma tryptophan and serotonin metabolism. *Psychoneuroendocrinology* 39, 170–178.

Gelegen C., van den Heuvel J., Collier D.A., Campbell I.C., Oppelaar H., Hessel E., Kas M.J. 2008. Dopaminergic and brain-derived neurotrophic factor signalling in inbred mice exposed to a restricted feeding schedule. *Genes Brain Behav.* 7(5):552-9.

Gérard, N., Pieters, G., Goffin, K., Bormans, G., Laere, K.V., 2011. Brain Type 1 Cannabinoid Receptor Availability in Patients with Anorexia and Bulimia Nervosa. *Biological Psychiatry* 70, 777–784.

Gerner, R.H., Sharp, B., 1982. CSF beta-endorphin-immunoreactivity in normal, schizophrenic, depressed, manic and anorexic subjects. *Brain Res.* 237, 244–247.

Giel, K.E., Kullmann, S., Preißl, H., Bischoff, S.C., Thiel, A., Schmidt, U., Zipfel, S., Teufel, M., 2013. Understanding the reward system functioning in anorexia nervosa: Crucial role of physical activity. *Biological Psychology* 94, 575–581

Gillberg, C., 1983. Low dopamine and serotonin levels in anorexia nervosa. *Am J Psychiatry* 140, 948–949.

Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V., Piomelli, D., 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18620–18625.

Godart, N.T., Perdereau, F., Jeammet, P., Flament, M.F., 2005. [Comorbidity between eating disorders and anxiety disorders: results]. *Encephale* 31, 152–161.

Golden N.H., Iglesias E.A., Jacobson M.S., Carey D., Meyer W., Schebendach J., Hertz S., Shenker IR. 2005. Alendronate for the treatment of osteopenia in anorexia nervosa: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(6):3179-85.

Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzmán, M., 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* 347, 369–373.

González-Yanes, C., Serrano, A., Bermúdez-Silva, F.J., Hernández-Dominguez, M., Páez-Ochoa, M.A., de Fonseca, F.R., Sánchez-Margalet, V., 2005. Oleyethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 289, E923–E929.

Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., Fetissof, S., Godart, N., Melchior, J.-C., Ramoz, N., Rovere-Jovene, C., Tolle, V., Viltart, O., Epelbaum, J., 2016. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci* 10, 256.

Grandison, L., Guidotti, A., 1977. Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology* 16, 533–536.

Gravina, G., Milano, W., Nebbiai, G., Piccione, C., Capasso, A., 2018. Medical Complications In Anorexia And Bulimia Nervosa. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.

Grinspoon, S., Thomas, E., Pitts, S., Gross, E., Mickley, D., Miller, K., Herzog, D., Klibanski, A., 2000. Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa. *Ann. Intern. Med.* 133, 790–794.

Gross, H., Ebert, M.H., Faden, V.B., Goldberg, S.C., Kaye, W.H., Caine, E.D., Hawks, R., Zinberg, N., 1983. A double-blind trial of delta 9-tetrahydrocannabinol in primary anorexia nervosa. *J Clin Psychopharmacol* 3, 165–171.

Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., Almouzni, G., 2007. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128, 721–733.

Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77–88.

Gull, W., 1874. Anorexia nervosa (apepsia hysterica. anorexia hysterica). *Trans Clin Soc London* 7, 22–28.

Gümmer, R., Giel, K.E., Schag, K., Resmark, G., Junne, F.P., Becker, S., Zipfel, S., Teufel, M., n.d. High Levels of Physical Activity in Anorexia Nervosa: A Systematic Review. *European Eating Disorders Review* 23, 333–344.

Guo, X., Li, H., Xu, H., Halim, V., Zhang, W., Wang, H., Ong, K.T., Woo, S.-L., Walzem, R.L., Mashek, D.G., Dong, H., Lu, F., Wei, L., Huo, Y., Wu, C., 2012. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS ONE* 7, e39286.

Guzmán, M., Verme, J.L., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., Piomelli, D., 2004. Oleoylethanolamide Stimulates Lipolysis by Activating the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR- α). *J. Biol. Chem.* 279, 27849–27854.

Gwirtsman, H.E., Kaye, W.H., George, D.T., Jimerson, D.C., Ebert, M.H., Gold, P.W., 1989. Central and peripheral ACTH and cortisol levels in anorexia nervosa and bulimia. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 61–69.

Haddad, F.S., Bann, S., Hill, R.A., Jones, D.H., 1997. Displaced stress fracture of the femoral neck in an active amenorrhoeic adolescent. *Br J Sports Med* 31, 70–72.

Hagan, M.M., Castañeda, E., Sumaya, I.C., Fleming, S.M., Galloway, J., Moss, D.E., 1998. The effect of hypothalamic peptide YY on hippocampal acetylcholine release in vivo: implications for limbic function in binge-eating behavior. *Brain Research* 805, 20–28.

Haider, S., Haleem, D.J., 2000. Decreases of brain serotonin following a food restriction schedule of 4 weeks in male and female rats. *Med. Sci. Monit.* 6, 1061–1067.

Haleem, D.J., 2012. Serotonin neurotransmission in anorexia nervosa. *Behav Pharmacol* 23, 478–495.

Halvorsen, I., Andersen, A., Heyerdahl, S., 2004. Good outcome of adolescent onset anorexia nervosa after systematic treatment. Intermediate to long-term follow-up of a representative county-sample. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13, 295–306.

Harris, R.B.S., Mitchell, T.D., Simpson, J., Redmann, S.M., Youngblood, B.D., Ryan, D.H., 2002. Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282, R77–R88.

Hay, P.J., Claudino, A.M., 2012. Clinical psychopharmacology of eating disorders: a research update. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 209–222.

Hebebrand, J., Albayrak, Ö., Adan, R., Antel, J., Dieguez, C., de Jong, J., Leng, G., Menzies, J., Mercer, J.G., Murphy, M., van der Plasse, G., Dickson, S.L., 2014. “Eating addiction”, rather than “food addiction”, better captures addictive-like eating behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 47, 295–306.

Hebebrand, J., Blum, W.F., Barth, N., Coners, H., Englaro, P., Juul, A., Ziegler, A., Warnke, A., Rascher, W., Remschmidt, H., 1997. Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Mol. Psychiatry* 2, 330–334.

Hebebrand, J., Exner, C., Hebebrand, K., Holtkamp, C., Casper, R.C., Remschmidt, H., Herpertz-Dahlmann, B., Klingenspor, M., 2003. Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia.

Physiology & Behavior, Proceedings from the 2002 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (SSIB) 79, 25–37.

Heimer L., Alheid G.F., de Olmos J.S., Groenewegen H.J., Haber S.N., Harlan R.E., Zahm D.S. 1997. The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 9(3):354-81. Review.

Hein, I.M., Huyser, C., 2010. [Olanzapine in the treatment of adolescents with anorexia nervosa]. *Tijdschr Psychiatr* 52, 417–421.

Heisler, L.K., Cowley, M.A., Tecott, L.H., Fan, W., Low, M.J., Smart, J.L., Rubinstein, M., Tatro, J.B., Marcus, J.N., Holstege, H., Lee, C.E., Cone, R.D., Elmquist, J.K., 2002. Activation of Central Melanocortin Pathways by Fenfluramine. *Science* 297, 609–611.

Henderson G., Johnson J.W., Ascher P. 1990. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J Physiol.* 430:189-212.

Herisson, F.M., Brooks, L.L., Waas, J.R., Levine, A.S., Olszewski, P.K., 2014. Functional relationship between oxytocin and appetite for carbohydrates versus saccharin. *Neuroreport* 25, 909–914.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.

Herpertz-Dahlmann, B., 2015. Adolescent eating disorders: update on definitions, symptomatology, epidemiology, and comorbidity. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 24, 177–196.

Herzog, W., Minne, H., Deter, C., Leidig, G., Schellberg, D., Wüster, C., Gronwald, R., Sarembe, E., Kröger, F., Bergmann, G., 1993. Outcome of bone mineral density in anorexia nervosa patients 11.7 years after first admission. *J. Bone Miner. Res.* 8, 597–605.

Hetherington, A.W., Ranson, S.W., 1942. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J. Comp. Neurol.* 76, 475–499.

Higuchi, S., Irie, K., Yamaguchi, R., Katsuki, M., Araki, M., Ohji, M., Hayakawa, K., Mishima, S., Akitake, Y., Matsuyama, K., Mishima, Kenji, Mishima, Kenichi, Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2012. Hypothalamic 2-Arachidonoylglycerol Regulates Multistage Process of High-Fat Diet Preferences. *PLOS ONE* 7, e38609.

Hill, M.N., Miller, G.E., Carrier, E.J., Gorzalka, B.B., Hillard, C.J., 2009. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1257–1262.

Hill, M.N., Patel, S., Carrier, E.J., Rademacher, D.J., Ormerod, B.K., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2005. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology* 30, 508–515.

Hill, W.F., 1961. Effects of activity deprivation on choice of an activity incentive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 54, 78–82.

Hnasko, T.S., Perez, F.A., Scouras, A.D., Stoll, E.A., Gale, S.D., Luquet, S., Phillips, P.E.M., Kremer, E.J., Palmiter, R.D., 2006. Cre recombinase-mediated restoration of nigrostriatal dopamine in dopamine-deficient mice reverses hypophagia and bradykinesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8858–8863.

Hoebel, B.G., 1985. Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 1133–1150.

Hoek, H.W., 2006. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Curr Opin Psychiatry* 19, 389–394.

Hoffmann, P., Terenius, L., Thorén, P., 1990. Cerebrospinal fluid immunoreactive β -endorphin concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. *Regulatory Peptides* 28, 233–239.

Hohmann, A.G., 2002. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem. Phys. Lipids* 121, 173–190.

Hollister, L.E., 1971. Hunger and appetite after single doses of marihuana, alcohol, and dextroamphetamine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 12, 44–49.

Holly, E.N., DeBold, J.F., Miczek, K.A., 2015. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 232, 4469–4479.

Holman, R.T., Adams, C.E., Nelson, R.A., Grater, S.J., Jaskiewicz, J.A., Johnson, S.B., Erdman, J.W., 1995. Patients with anorexia nervosa demonstrate deficiencies of selected essential fatty acids, compensatory changes in nonessential fatty acids and decreased fluidity of plasma lipids. *J. Nutr.* 125, 901–907.

Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., DiLeone, R.J., 2006. Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. *Neuron* 51, 801–810.

Hotta, M., Shibasaki, T., Masuda, A., Imaki, T., Demura, H., Ling, N., SHIZUME, K., 1986. The Responses of Plasma Adrenocorticotropin and Cortisol to Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and Cerebrospinal Fluid Immunoreactive CRH in Anorexia Nervosa Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 62, 319–324.

- Howard, C.D., Li, H., Geddes, C.E., Jin, X., 2017. Dynamic Nigrostriatal Dopamine Biases Action Selection. *Neuron* 93, 1436-1450.e8.
- Hudson, J.I., Hiripi, E., Pope, H.G., Kessler, R.C., 2007. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biol. Psychiatry* 61, 348–358.
- Hutchins, H.L., Li, Y., Hannon, K., Watkins, B.A., 2011. Eicosapentaenoic acid decreases expression of anandamide synthesis enzyme and cannabinoid receptor 2 in osteoblast-like cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 195–200.
- Hutschemaekers, G.J.M., 2003. Multidisciplinary guidelines in Dutch mental health care: plans, bottlenecks and possible solutions. *Int J Integr Care* 3.
- Hütter, G., Ganepola, S., Hofmann, W.-K., 2009. The hematology of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 42, 293–300.
- Ishiwari, K., Weber, S.M., Mingote, S., Correa, M., Salamone, J.D., 2004. Accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: modulation of work output by different ratio or force requirements. *Behavioural Brain Research* 151, 83–91.
- Ivarsson, T., Råstam, M., Wentz, E., Gillberg, I.C., Gillberg, C., 2000. Depressive disorders in teenage-onset anorexia nervosa: a controlled longitudinal, partly community-based study. *Compr Psychiatry* 41, 398–403.
- Izzo, A.A., Sharkey, K.A., 2010. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol. Ther.* 126, 21–38.
- Jager, G., Witkamp, R.F., 2014. The endocannabinoid system and appetite: relevance for food reward. *Nutrition Research Reviews* 27, 172–185.
- Jahng, J.W., Kim, J.G., Kim, H.J., Kim, B.-T., Kang, D.-W., Lee, J.-H., 2007. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res.* 1150, 100–107.
- Jamshidi, N., Taylor, D.A., 2001. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1151–1154.
- Jarrett, M.M., Scantlebury, J., Parker, L.A., 2007. Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on quinine palatability and AM251 on sucrose and quinine palatability using the taste reactivity test. *Physiol. Behav.* 90, 425–430.
- Jbilo, O., Ravinet-Trillou, C., Arnone, M., Buisson, I., Bribes, E., Péleraux, A., Pénarier, G., Soubrié, P., Le Fur, G., Galiègue, S., Casellas, P., 2005. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J.* 19, 1567–1569.

- Jean, A., Conductier, G., Manrique, C., Bouras, C., Berta, P., Hen, R., Charnay, Y., Bockaert, J., Compan, V., 2007. Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16335–16340.
- Jennings, K.M., Wildes, J.E., Coccaro, E.F., 2017. Intermittent explosive disorder and eating disorders: Analysis of national comorbidity and research samples. *Compr Psychiatry* 75, 62–67.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jeong, J.Y., Lee, D.H., Kang, S.S., 2013. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinology and Metabolism* 28, 288–296.
- Jerlhag, E., Janson, A.C., Waters, S., Engel, J.A., 2012. Concomitant Release of Ventral Tegmental Acetylcholine and Accumbal Dopamine by Ghrelin in Rats. *PLOS ONE* 7, e49557.
- Johansen, J.E., Fetissov, S., Fischer, H., Arvidsson, S., Hökfelt, T., Schalling, M., 2003. Approaches to anorexia in rodents: focus on the anx/anx mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 480, 171–176.
- Johnson, P.M., Kenny, P.J., 2010. Dopamine D₂ receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience* 13, 635–641.
- Joyce, E.M., Koob, G.F., 1981. Amphetamine-, scopolamine- and caffeine-induced locomotor activity following 6-hydroxydopamine lesions of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology* 73, 311–313.
- Jump, D.B., 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 155–164.
- Kageyama, H., Takenoya, F., Shiba, K., Shioda, S., 2010. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 44, 133–138.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., Wakabayashi, I., 2001. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438–2443.
- Kanarek, R.B., Collier, G.H., 1983. Self-starvation: a problem of overriding the satiety signal? *Physiol. Behav.* 30, 307–311.
- Kanarek, R.B., Gerstein, A.V., Wildman, R.P., Mathes, W.F., D’Anci, K.E., 1998. Chronic Running-Wheel Activity Decreases Sensitivity to Morphine-Induced Analgesia in Male and Female Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 61, 19–27.

- Karra, E., Chandarana, K., Batterham, R.L., 2009. The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 19–25.
- Katona, I., Freund, T.F., 2008. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14, 923–930.
- Katzman, D.K., 2005. Medical complications in adolescents with anorexia nervosa: a review of the literature. *Int J Eat Disord* 37 Suppl, S52-59; discussion S87-89.
- Kawahara, Y., Kawahara, H., Kaneko, F., Yamada, M., Nishi, Y., Tanaka, E., Nishi, A., 2009. Peripherally administered ghrelin induces bimodal effects on the mesolimbic dopamine system depending on food-consumptive states. *Neuroscience* 161, 855–864.
- Kawai, K., Nakashima, M., Kojima, M., Yamashita, S., Takakura, S., Shimizu, M., Kubo, C., Sudo, N., 2017. Ghrelin activation and neuropeptide Y elevation in response to medium chain triglyceride administration in anorexia nervosa patients. *Clin Nutr ESPEN* 17, 100–104.
- Kaye, W.H., 1997. Anorexia nervosa, obsessional behavior, and serotonin. *Psychopharmacol Bull* 33, 335–344.
- Kaye, W.H., Bailer, U.F., Frank, G.K., Wagner, A., Henry, S.E., 2005. Brain imaging of serotonin after recovery from anorexia and bulimia nervosa. *Physiol. Behav.* 86, 15–17.
- Kaye, W.H., Bulik, C.M., Thornton, L., Barbarich, N., Masters, K., 2004. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. *Am J Psychiatry* 161, 2215–2221.
- Kaye, W.H., Ebert, M.H., Raleigh, M., Lake, R., 1984. Abnormalities in CNS monoamine metabolism in anorexia nervosa. *Arch. Gen. Psychiatry* 41, 350–355.
- Kaye, W.H., Frank, G.K., McConaha, C., 1999. Altered dopamine activity after recovery from restricting-type anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 21, 503–506.
- Kaye, W.H., Gwirtsman, H.E., Obarzanek, E., George, D.T., 1988. Relative importance of calorie intake needed to gain weight and level of physical activity in anorexia nervosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 989–994.
- Kaye, W.H., Gwirtsman, H.E., Obarzanek, E., George, T., Jimerson, D.C., Ebert, M.H., 1986. Caloric intake necessary for weight maintenance in anorexia nervosa: nonbulimics require greater caloric intake than bulimics. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 435–443.
- Keating, C., 2010. Theoretical perspective on anorexia nervosa: The conflict of reward. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34, 73–79.

- Keating, C., Tilbrook, A.J., Rossell, S.L., Enticott, P.G., Fitzgerald, P.B., 2012. Reward processing in anorexia nervosa. *Neuropsychologia* 50, 567–575.
- Keel, P.K., Dorer, D.J., Franko, D.L., Jackson, S.C., Herzog, D.B., 2005. Postremission Predictors of Relapse in Women With Eating Disorders. *AJP* 162, 2263–2268.
- Keller, P.A., Compan, V., Bockaert, J., Giacobino, J.-P., Charnay, Y., Bouras, C., Assimacopoulos-Jeannet, F., 2006. Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites. *Peptides* 27, 1328–1334.
- Kelley, A.E., Bakshi, V.P., Haber, S.N., Steininger, T.L., Will, M.J., Zhang, M., 2002. Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology & Behavior, Proceedings from the 2001 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (SSIB)* 76, 365–377.
- Kelley, A.E., Baldo, B.A., Pratt, W.E., Will, M.J., 2005. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. *Physiology & Behavior, Purdue University Ingestive Behavior Research Center Symposium. Dietary Influences on Obesity: Environment, Behavior and Biology* 86, 773–795.
- Kennedy, A., Kohn, M., Lammi, A., Clarke, S., 2004. Iron status and haematological changes in adolescent female inpatients with anorexia nervosa. *J Paediatr Child Health* 40, 430–432.
- Kim, C., Kim, S., Park, S., 2017. Neurogenic Effects of Ghrelin on the Hippocampus. *Int J Mol Sci* 18.
- Kim, K.C., Choi, S.-W., 2015. Nutritional Epigenetics and Aging, in: *Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Interventions, Healthy Ageing and Longevity*. Springer, Cham, pp. 1–28.
- Kim Y.R., Eom J.S., Yang J.W., Kang J., Treasure J. 2015. The impact of oxytocin on food intake and emotion recognition in patients with eating disorders: a double blind single dose within-subject crossover design.10:e0137514.
- Kim, S.F., 2012. Animal models of eating disorders. *Neuroscience* 211, 2–12.
- Kim Y.R., Kim C.H., Cardi V., Eom J.S., Seong Y., Treasure J. 2014. Intranasal oxytocin attenuates attentional bias for eating and fat shape stimuli in patients with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. 44:133-42.
- Kim Y-R., Kim C-H., Park J.H., Pyo J., Treasure J. 2013. The impact of intranasal oxytocin on attention to social emotional stimuli in patients with anorexia nervosa: a double blind within-subject crossover experiment.9:e90721.
- Kim, Y.-R., Eom, J.-S., Yang, J.-W., Kang, J., Treasure, J., 2015. The Impact of Oxytocin on Food Intake and Emotion Recognition in Patients with Eating Disorders: A

Double Blind Single Dose Within-Subject Cross-Over Design. *PLoS ONE* 10, e0137514.

Kim, Y.-R., Kim, J.-H., Kim, M.J., Treasure, J., 2014. Differential methylation of the oxytocin receptor gene in patients with anorexia nervosa: a pilot study. *PLoS ONE* 9, e88673.

Kipman, A., Gorwood, P., Mouren-Siméoni, M.C., Adès, J., 1999. Genetic factors in anorexia nervosa. *European Psychiatry* 14, 189–198.

Kirkham, T.C., 2003. Endogenous cannabinoids: a new target in the treatment of obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R343-344.

Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., Di Marzo, V., 2002. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 136, 550–557.

Kirsz, K., Zieba, D.A., 2011. Ghrelin-mediated appetite regulation in the central nervous system. *Peptides* 32, 2256–2264.

Klein, D.A., Mayer, L.E.S., Schebendach, J.E., Walsh, B.T., 2007. Physical activity and cortisol in Anorexia Nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 32, 539–547.

Klenerova, V., Sery, O., Hynie, S., 2008. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes in the rat anterior pituitary after two types of restraint stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148, 415–420.

Klenotich, S.J., Dulawa, S.C., 2012. The Activity-Based Anorexia Mouse Model, in: *Psychiatric Disorders, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 377–393.

Klump, K.L., Miller, K.B., Keel, P.K., McGUE, M., Iacono, W.G., 2001. Genetic and environmental influences on anorexia nervosa syndromes in a population-based twin sample. *Psychological Medicine* 31, 737–740.

Kobayakawa, T., Ogawa, H., Kaneda, H., Ayabe-Kanamura, S., Saito, S., 1999. Spatio-temporal Analysis of Cortical Activity Evoked by Gustatory Stimulation in Humans. *Chem Senses* 24, 201–209.

Koch, J.E., Matthews, S.M., 2001. Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. *Nutr Neurosci* 4, 179–187.

Koch, M., 2017. Cannabinoid Receptor Signaling in Central Regulation of Feeding Behavior: A Mini-Review. *Front Neurosci* 11, 293.

Koch, M., Horvath, T.L., 2014. Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Mol. Psychiatry* 19, 752–761.

- Kojima, M., Hosoda, H., Kangawa, K., 2001. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm. Res.* 56 Suppl 1, 93–97.
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A.B., Fekete, C., Korbónits, M., 2008. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS ONE* 3, e1797.
- Kolb, B., Nonneman, A.J., 1975. Prefrontal cortex and the regulation of food intake in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 88, 806–815.
- Koob, G.F., Swerdlow, N.R., 1988. The Functional Output of the Mesolimbic Dopamine System. *Annals of the New York Academy of Sciences* 537, 216–227.
- Kortegaard, L.S., Hoerder, K., Joergensen, J., Gillberg, C., Kyvik, K.O., 2001. A preliminary population-based twin study of self-reported eating disorder. *Psychological Medicine* 31, 361–365.
- Kostrzewa, E., Elburg, A.A. van, Sanders, N., Sternheim, L., Adan, R.A.H., Kas, M.J.H., 2013. Longitudinal Changes in the Physical Activity of Adolescents with Anorexia Nervosa and Their Influence on Body Composition and Leptin Serum Levels after Recovery. *PLOS ONE* 8, e78251.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., Wahli, W., 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 11, 779–791.
- Kringelbach, M.L., Berridge, K.C., 2009. Towards a functional neuroanatomy of pleasure and happiness. *Trends in Cognitive Sciences* 13, 479–487.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S., 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.
- Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., Kutok, J.L., Kung, A.L., Armstrong, S.A., 2008. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355–368.
- 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, 185–187.

- Kutlu S., Aydin M., Alcin E., Ozcan M., Bakos J., Jezova D., Yilmaz B. 2009. Leptin modulates noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin levels in female rats: a microdialysis study. *Brain Res.*4;1317:87-91.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Lambe, E.K., Fillman, S.G., Webster, M.J., Shannon Weickert, C., 2011. Serotonin receptor expression in human prefrontal cortex: balancing excitation and inhibition across postnatal development. *PLoS ONE* 6, e22799.
- Land, B.B., Narayanan, N.S., Liu, R.-J., Gianessi, C.A., Brayton, C.E., Grimaldi, D.M., Sarhan, M., Guarnieri, D.J., Deisseroth, K., Aghajanian, G.K., DiLeone, R.J., 2014. Medial prefrontal D1 dopamine neurons control food intake. *Nat. Neurosci.* 17, 248–253.
- Langan, S.M., Farrell, P.M., 1985. Vitamin E, vitamin A and essential fatty acid status of patients hospitalized for anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 41, 1054–1060.
- Laque, A., Yu, S., Qualls-Creekmore, E., Gettys, S., Schwartzburg, C., Bui, K., Rhodes, C., Berthoud, H.-R., Morrison, C.D., Richards, B.K., Münzberg, H., 2015. Leptin modulates nutrient reward via inhibitory galanin action on orexin neurons. *Mol Metab* 4, 706–717.
- Lau, B.K., Cota, D., Cristino, L., Borgland, S.L., 2017. Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology* 124, 38–51.
- Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., Hwang, D., 2001. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 16683–16689.
- Lee, S., Ng, K.L., Kwok, K.P.S., Thomas, J.J., Becker, A.E., 2012. Gastrointestinal dysfunction in Chinese patients with fat-phobic and nonfat-phobic anorexia nervosa. *Transcult Psychiatry* 49, 678–695.
- Legrand, R., Lucas, N., Breton, J., Azhar, S., do Rego, J.-C., Déchelotte, P., Coëffier, M., Fetissov, S.O., 2016. Ghrelin treatment prevents development of activity based anorexia in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 26, 948–958.
- Lenka, A., Arumugham, S.S., Christopher, R., Pal, P.K., 2016. Genetic substrates of psychosis in patients with Parkinson’s disease: A critical review. *J. Neurol. Sci.* 364, 33–41.
- Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 108–118.

Levine, A.S., Morley, J.E., Gosnell, B.A., Billington, C.J., Bartness, T.J., 1985. Opioids and consummatory behavior. *Brain Res. Bull.* 14, 663–672.

Levinson C.A., Rodebaugh T.L., Fewell L., Kass A.E., Riley E.N., Stark L., McCallum K., Lenze E.J. 2015. D-Cycloserine facilitation of exposure therapy improves weight regain in patients with anorexia nervosa: a pilot randomized controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 76(6):e787-93.

Lewis, D.A., Sesack, S.R., 1997. Chapter VI Dopamine systems in the primate brain, in: Bloom, F.E., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, The Primate Nervous System, Part I.* Elsevier, pp. 263–375.

Lewis, D.Y., Brett, R.R., 2010. Activity-based anorexia in C57/BL6 mice: effects of the phytocannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and the anandamide analogue, OMDM-2. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 622–631.

Leyton, J., Drury, P.J., Crawford, M.A., 1987. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br. J. Nutr.* 57, 383–393.

Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.-H., Handschin, C., Li, S., Yang, W., Pei, L., Uldry, M., Tontonoz, P., Newgard, C.B., Spiegelman, B.M., 2005. Hyperlipidemic Effects of Dietary Saturated Fats Mediated through PGC-1 β Coactivation of SREBP. *Cell* 120, 261–273.

Lindfors, C., Nilsson, I.A.K., Garcia-Roves, P.M., Zuberi, A.R., Karimi, M., Donahue, L.R., Roopenian, D.C., Mulder, J., Uhlén, M., Ekström, T.J., Davisson, M.T., Hökfelt, T.G.M., Schalling, M., Johansen, J.E., 2011. Hypothalamic mitochondrial dysfunction associated with anorexia in the anx/anx mouse. *PNAS* 108, 18108–18113.

Lindvall, O., 1983. Dopamine and norepinephrine containing neuron system: Their anatomy in the rat brain. *Chemical Neuroanatomy* 229–255.

Louis, G.W., Leininger, G.M., Rhodes, C.J., Myers, M.G., 2010. Direct innervation and modulation of orexin neurons by lateral hypothalamic LepRb neurons. *J. Neurosci.* 30, 11278–11287.

Löwe, B., Zipfel, S., Buchholz, C., Dupont, Y., Reas, D.L., Herzog, W., 2001. Long-term outcome of anorexia nervosa in a prospective 21-year follow-up study. *Psychological Medicine* 31, 881–890.

Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838.

Lucas, A.R., Crowson, C.S., O’Fallon, W.M., Melton, L.J., 1999. The ups and downs of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 26, 397–405.

- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Luo, M., Zhou, J., Liu, Z., 2015. Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond. *Learn. Mem.* 22, 452–460.
- Lutter, M., Nestler, E.J., 2009. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *J Nutr* 139, 629–632.
- Mackie, K., 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 299–325.
- Madigan, C., Ryan, M., Owens, D., Collins, P., Tomkin, G.H., 2000. Dietary unsaturated fatty acids in type 2 diabetes: higher levels of postprandial lipoprotein on a linoleic acid-rich sunflower oil diet compared with an oleic acid-rich olive oil diet. *Diabetes Care* 23, 1472–1477.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1, 1155–1161.
- Mahler, S.V., Smith, K.S., Berridge, K.C., 2007. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances “liking” of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology* 32, 2267–2278.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.-J., 1993. Glucocorticoid regulation of cannabinoid receptor messenger RNA levels in the rat caudate-putamen. An in situ hybridization study. *Neuroscience Letters* 156, 51–53.
- Makrides, M., Neumann, M.A., Byard, R.W., Simmer, K., Gibson, R.A., 1994. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 189–194.
- Maloney, E., Sweet, I.R., Hockenbery, D.M., Pham, M., Rizzo, N.O., Tateya, S., Handa, P., Schwartz, M.W., Kim, F., 2009. Activation of NF-κB by Palmitate in Endothelial Cells: A Key Role for NADPH Oxidase-Derived Superoxide in Response to TLR4 Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, 1370–1375.
- Mancino, S., Burokas, A., Gutiérrez-Cuesta, J., Gutiérrez-Martos, M., Martín-García, E., Pucci, M., Falconi, A., D’Addario, C., Maccarrone, M., Maldonado, R., 2015. Epigenetic and Proteomic Expression Changes Promoted by Eating Addictive-Like Behavior. *Neuropsychopharmacology* 40, 2788–2800.
- Manfredi, L.H., Zanon, N.M., Garófalo, M.A., Navegantes, L.C.C., Kettelhut, I.C., 2013. Effect of short-term cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats. *Journal of Applied Physiology* 115, 1496–1505.

- Marco, E.M., García-Gutiérrez, M.S., Bermúdez-Silva, F.-J., Moreira, F., Guimarães, F., Manzanares, J., Viveros, M.-P., 2011. Endocannabinoid System and Psychiatry: In Search of a Neurobiological Basis for Detrimental and Potential Therapeutic Effects. *Front. Behav. Neurosci.* 5.
- Mariño-Ramírez, L., Kann, M.G., Shoemaker, B.A., Landsman, D., 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* 2, 719–729.
- Marshall, J.F., Berrios, N., Sawyer, S., 1980. Neostriatal dopamine and sensory inattention. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 94, 833–846.
- Martel, P., Fantino, M., 1996. Influence of the amount of food ingested on mesolimbic dopaminergic system activity: A microdialysis study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 55, 297–302.
- Martinussen, M., Friberg, O., Schmierer, P., Kaiser, S., Øvergård, K.T., Neunhoffer, A.-L., Martinsen, E.W., Rosenvinge, J.H., 2017. The comorbidity of personality disorders in eating disorders: a meta-analysis. *Eat Weight Disord* 22, 201–209.
- Marzo, V.D., Capasso, R., Matias, I., Aviello, G., Petrosino, S., Borrelli, F., Romano, B., Orlando, P., Capasso, F., Izzo, A.A., 2008. The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. *British Journal of Pharmacology* 153, 1272–1280.
- Marzo, V.D., Després, J.-P., 2009. CB1 antagonists for obesity—what lessons have we learned from rimonabant? *Nature Reviews Endocrinology* 5, 633–638.
- Massiera, F., Barbry, P., Guesnet, P., Joly, A., Luquet, S., Moreilhon-Brest, C., Mohsen-Kanson, T., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., 2010. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J. Lipid Res.* 51, 2352–2361.
- Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., Guesnet, P., Amri, E.-Z., Negrel, R., Ailhaud, G., 2003. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development a human health concern? *J. Lipid Res.* 44, 271–279.
- Matias, I., Carta, G., Murru, E., Petrosino, S., Banni, S., Di Marzo, V., 2008. Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in mouse adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781, 52–60.
- Matias, I., Di Marzo, V., 2007. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 27–37.
- Matias, I., Gatta-Cherifi, B., Cota, D., 2012. Obesity and the Endocannabinoid System: Circulating Endocannabinoids and Obesity. *Curr Obes Rep* 1, 229–235.

- Mattingly, D., Bhanji, S., 1995. Hypoglycaemia and anorexia nervosa. *J R Soc Med* 88, 191–195.
- Mayer, L.E.S., Roberto, C.A., Glasofer, D.R., Etu, S.F., Gallagher, D., Wang, J., Heymsfield, S.B., Pierson, R.N., Attia, E., Devlin, M.J., Walsh, B.T., 2007. Does Percent Body Fat Predict Outcome in Anorexia Nervosa? *AJP* 164, 970–972.
- Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B., Cota, D., 2015. The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 524–537.
- McCullough, L.D., Salamone, J.D., 1992. Involvement of nucleus accumbens dopamine in the motor activity induced by periodic food presentation: a microdialysis and behavioral study. *Brain Research* 592, 29–36.
- McGowan, P.O., Meaney, M.J., Szyf, M., 2008. Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain Res.* 1237, 12–24.
- McKnight, R.F., Park, R.J., 2010. Atypical antipsychotics and anorexia nervosa: a review. *Eur Eat Disord Rev* 18, 10–21.
- McLaughlin, P.J., Winston, K., Swezey, L., Wisniecki, A., Aberman, J., Tardif, D.J., Betz, A.J., Ishiwari, K., Makriyannis, A., Salamone, J.D., 2003. The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behavior in a variety of tasks in rats. *Behavioural Pharmacology* 14, 583.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.
- Meehan, K.G., Loeb, K.L., Roberto, C.A., Attia, E., 2006. Mood change during weight restoration in patients with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 39, 587–589.
- Melis, T., Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A., Melis, M.R., 2007. The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extracellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neurosci. Lett.* 419, 231–235.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D.M., Katan, M.B., 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1146–1155.
- Méquinion, M., Chauveau, C., Viltart, O., 2015. The use of animal models to decipher physiological and neurobiological alterations of anorexia nervosa patients. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 68.

Méquinion, M., Langlet, F., Zgheib, S., Dickson, S., Dehouck, B., Chauveau, C., Viltart, O., 2013. Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 15.

Mercader, J.M., Ribasés, M., Gratacòs, M., González, J.R., Bayés, M., de Cid, R., Badía, A., Fernández-Aranda, F., Estivill, X., 2007. Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. *Genes Brain Behav.* 6, 706–716.

Miao, F., Natarajan, R., 2005. Mapping global histone methylation patterns in the coding regions of human genes. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4650–4661.

Miles, E.A., Calder, P.C., 2012. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *British Journal of Nutrition* 107, S171–S184.

Miljic, D., Pekic, S., Djurovic, M., Doknic, M., Milic, N., Casanueva, F.F., Ghatei, M., Popovic, V., 2006. Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1491–1495.

Miller K.K., Wexler T.L., Zha A.M., Lawson E.A., Meenaghan E.M., Misra M., Binstock A.B., Herzog D.B., Klibanski A. 2007. Androgen deficiency: association with increased anxiety and depression symptom severity in anorexia nervosa. *J Clin Psychiatry.* 68(6):959-65.

Miller K.K., Deckersbach T., Rauch S.L., Fischman A.J., Grieco K.A., Herzog D.B., Klibanski A. 2004. Testosterone administration attenuates regional brain hypometabolism in women with anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 132(3):197-207.

Miller K.K., Grieco K.A., Klibanski A. 2005. Testosterone administration in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:1428-1433.

Miller K.K., Meenaghan E., Lawson E.A., Misra M., Gleysteen S., Schoenfeld D., Herzog D., Klibanski A. 2001. Effects of risedronate and low-dose transdermal testosterone on bone mineral density in women with anorexia nervosa: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol.* 96(7):2081-8.

Miller, L.K., Devi, L.A., 2011. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol. Rev.* 63, 461–470.

Miller, R., 2009. Mechanisms of action of antipsychotic drugs of different classes, refractoriness to therapeutic effects of classical neuroleptics, and individual variation in sensitivity to their actions: Part II. *Curr Neuropharmacol* 7, 315–330.

Millington, G.W., 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 4, 18.

Miles E.A., Calder P.C. 2014. Omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and allergic diseases in infancy and childhood. *Curr Pharm Des.* 20(6):946-53.

Milte, C.M., Parletta, N., Buckley, J.D., Coates, A.M., Young, R.M., Howe, P.R.C., 2012. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, cognition, and behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomized controlled trial. *Nutrition* 28, 670–677.

Mineur, Y.S., Einstein, E.B., Bentham, M.P., Wigstrand, M.B., Blakeman, S., Newbold, S.A., Picciotto, M.R., 2015. Expression of the 5-HT1A serotonin receptor in the hippocampus is required for social stress resilience and the antidepressant-like effects induced by the nicotinic partial agonist cytisine. *Neuropsychopharmacology* 40, 938–946.

Miranda, T.B., Jones, P.A., 2007. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J. Cell. Physiol.* 213, 384–390.

Mischoulon, D., Eddy, K.T., Keshaviah, A., Dinescu, D., Ross, S.L., Kass, A.E., Franko, D.L., Herzog, D.B., 2011. Depression and eating disorders: treatment and course. *J Affect Disord* 130, 470–477.

Misra M., Katzman D., Miller K.K., Mendes N., Snelgrove D., Russell M., Goldstein M.A., Ebrahimi S., Clauss L., Weigel T., Mickley D., Schoenfeld D.A., Herzog D.B., Klibanski A. 2011. Physiologic estrogen replacement increases bone density in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Bone Miner Res.* 26(10):2430-8.

Misra M., Katzman D.K., Estella N.M., Eddy K.T., Weigel T., Goldstein M.A., Miller K.K., Klibanski A. 2013. Impact of physiologic estrogen replacement on anxiety symptoms, body shape perception, and eating attitudes in adolescent girls with anorexia nervosa: data from a randomized controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 2013 74(8):e765-71.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.

Mitchell, J.E., Crow, S., 2006. Medical complications of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Curr Opin Psychiatry* 19, 438–443.

Montecucco, F., Di Marzo, V., 2012. At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 331–340.

Monteleone P., Matias I., Martiadis V., De Petrocellis L., Maj M., Di Marzo V. 2005. Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa

and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 30(6):1216-21.

Monteleone, A.M., Scognamiglio, P., Volpe, U., Di Maso, V., Monteleone, P., 2016. Investigation of Oxytocin Secretion in Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa: Relationships to Temperament Personality Dimensions. *Eur Eat Disord Rev* 24, 52–56.

Monteleone, P., Bifulco, M., Di Filippo, C., Gaggero, P., Canestrelli, B., Monteleone, F., Proto, M.C., Di Genio, M., Grimaldi, C., Maj, M., 2009. Association of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms with anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence for synergistic effects. *Genes Brain Behav.* 8, 728–732.

Monteleone, P., Castaldo, E., Maj, M., 2008. Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regul. Pept.* 149, 39–50.

Moore, C.A., Bokor, B.R., 2017. Anorexia Nervosa, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38.

Moore, R.Y., Bloom, F.E., 1978. Central Catecholamine Neuron Systems: Anatomy and Physiology of the Dopamine Systems. *Annual Review of Neuroscience* 1, 129–169.

Morin, L.P., 2013. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp. Neurol.* 243, 4–20.

Morozov, Y.M., Koch, M., Rakic, P., Horvath, T.L., 2017. Cannabinoid type 1 receptor-containing axons innervate NPY/AgRP neurons in the mouse arcuate nucleus. *Mol Metab* 6, 374–381.

Morton, G.J., 2007. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J. Physiol. (Lond.)* 583, 437–443.

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., Schwartz, M.W., 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.

Moscarello, J.M., Ben-Shahar, O., Ettenberg, A., 2010. External incentives and internal states guide goal-directed behavior via the differential recruitment of the nucleus accumbens and the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 170, 468–477.

Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.

Muroya, S., Funahashi, H., Yamanaka, A., Kohno, D., Uramura, K., Nambu, T., Shibahara, M., Kuramochi, M., Takigawa, M., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Shioda, S., Yada, T., 2004. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin:

orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1524–1534.

Murphy, K.G., Bloom, S.R., 2005. Peripheral influences on central melanocortin neurons. *Peptides* 26, 1744–1752.

Murray, S., Tulloch, A., Gold, M.S., Avena, N.M., 2014. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 540–552.

Mustelin, L., Silén, Y., Raevuori, A., Hoek, H.W., Kaprio, J., Keski-Rahkonen, A., 2016. The DSM-5 diagnostic criteria for anorexia nervosa may change its population prevalence and prognostic value. *J Psychiatr Res* 77, 85–91.

Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., Gaspar, P., 2016. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct* 221, 535–561.

Nagamitsu, S., Araki, Y., Ioji, T., Yamashita, F., Ozono, S., Kouno, M., Iizuka, C., Hara, M., Shibuya, I., Ohya, T., Yamashita, Y., Tsuda, A., Kakuma, T., Matsuishi, T., 2011. Prefrontal brain function in children with anorexia nervosa: a near-infrared spectroscopy study. *Brain Dev.* 33, 35–44.

Nakabayashi, M., Suzuki, T., Takahashi, K., Totsune, K., Muramatsu, Y., Kaneko, C., Date, F., Takeyama, J., Darnel, A.D., Moriya, T., Sasano, H., 2003. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 205, 43–50.

Nakazato, M., Tchanturia, K., Schmidt, U., Campbell, I.C., Treasure, J., Collier, D.A., Hashimoto, K., Iyo, M., 2009. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and set-shifting in currently ill and recovered anorexia nervosa (AN) patients. *Psychol Med* 39, 1029–1035.

Narayanan, N.S., Guarnieri, D.J., DiLeone, R.J., 2010. Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding. *Frontiers in Neuroendocrinology, Energy Homeostasis* 31, 104–112.

Narita, Minoru, Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, Michiko, Khotib, J., Miyatake, M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S., Suzuki, T., 2006. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J. Neurosci.* 26, 398–405.

Naruse, T., Amano, H., Koizumi, Y., 1991. Possible involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in diazepam-induced hyperphagia in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 5, 677–693.

Nestler, E.J., 2005. The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Sci Pract Perspect* 3, 4–10.

Nielsen, M.J., Petersen, G., Astrup, A., Hansen, H.S., 2004. Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide. *J. Lipid Res.* 45, 1027–1029.

Nirenberg, M.J., Waters, C., 2006. Compulsive eating and weight gain related to dopamine agonist use. *Movement Disorders* 21, 524–529.

Nishizaki, Y., Shimada, K., Tani, S., Ogawa, T., Ando, J., Takahashi, M., Yamamoto, M., Shinozaki, T., Miyauchi, K., Nagao, K., Hirayama, A., Yoshimura, M., Komuro, I., Nagai, R., Daida, H., 2014. Significance of Imbalance in the Ratio of Serum n-3 to n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Patients With Acute Coronary Syndrome. *American Journal of Cardiology* 113, 441–445.

Nogueiras, R., Veyrat-Durebex, C., Suchanek, P.M., Klein, M., Tschöp, J., Caldwell, C., Woods, S.C., Wittmann, G., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., Reizes, O., Rohner-Jeanrenaud, F., Tschöp, M.H., 2008. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes* 57, 2977–2991.

Nott, A., Watson, P.M., Robinson, J.D., Crepaldi, L., Riccio, A., 2008. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* 455, 411–415.

Novak, T.E., Babcock, T.A., Jho, D.H., Helton, W.S., Espat, N.J., 2003. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284, L84-89.

O'Hara, C.B., Campbell, I.C., Schmidt, U., 2015. A reward-centred model of anorexia nervosa: A focussed narrative review of the neurological and psychophysiological literature. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 52, 131–152.

Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., Olanow, C.W., 2000. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 23, S8–S19.

Ogawa, S.K., Cohen, J.Y., Hwang, D., Uchida, N., Watabe-Uchida, M., 2014. Organization of Monosynaptic Inputs to the Serotonin and Dopamine Neuromodulatory Systems. *Cell Reports* 8, 1105–1118.

Okano, M., Xie, S., Li, E., 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19, 219–220.

Okita, K., Shiina, A., Nakazato, M., Iyo, M., 2013. Tansospirone, a 5-HT1A partial agonist is effective in treating anorexia nervosa: a case series. *Ann Gen Psychiatry* 12, 7.

Olney, J.W., 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719–721.

- Ono, K., Kuwabara, Y., Han, J., 2011. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *FEBS J.* 278, 1619–1633.
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertáler, L., Wang, L., Kunos, G., 2005. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115, 1298–1305.
- Pallister, E., Waller, G., 2008. Anxiety in the eating disorders: understanding the overlap. *Clin Psychol Rev* 28, 366–386.
- Palmiter, R.D., 2007. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends in Neurosciences* 30, 375–381.
- Pan, W., Hsueh, H., Tu, H., Kastin, A.J., 2008. Developmental changes of leptin receptors in cerebral microvessels: unexpected relation to leptin transport. *Endocrinology* 149, 877–885.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., Shohami, E., 2001. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413, 527–531.
- Papaleo, F., Kieffer, B.L., Tabarin, A., Contarino, A., 2007. Decreased motivation to eat in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3398–3405.
- Park, J.-H., Shim, H.-M., Na, A.-Y., Bae, J.-H., Im, S.-S., Song, D.-K., 2015. Orexin A regulates plasma insulin and leptin levels in a time-dependent manner following a glucose load in mice. *Diabetologia* 58, 1542–1550.
- Parsons L.H., Hurd Y.L. 2015. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 16(10):579-94.
- Peet, M., Brind, J., Ramchand, C.N., Shah, S., Vankar, G.K., 2001. Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 49, 243–251.
- Perello, M., Dickson, S.L., 2015. Ghrelin signalling on food reward: a salient link between the gut and the mesolimbic system. *J. Neuroendocrinol.* 27, 424–434.
- Perera, H., Jeewandara, K.C., Seneviratne, S., Guruge, C., 2012. Combined ω 3 and ω 6 Supplementation in Children With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) Refractory to Methylphenidate Treatment: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Child Neurol* 27, 747–753.

- Perez-Martinez, P., Garcia-Rios, A., Delgado-Lista, J., Perez-Jimenez, F., Lopez-Miranda, J., 2011. Mediterranean Diet Rich in Olive Oil and Obesity, Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus
- Perica, M.M., Delas, I., 2011. Essential fatty acids and psychiatric disorders. *Nutr Clin Pract* 26, 409–425.
- Perreault, M.M., Ostrop, N.J., Tierney, M.G., 1997. Efficacy and Safety of Intravenous Phosphate Replacement in Critically Ill Patients. *Ann Pharmacother* 31, 683–688.
- Pertwee, R.G., 2010. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* 17, 1360–1381.
- Petersen, G., Sørensen, C., Schmid, P.C., Artmann, A., Tang-Christensen, M., Hansen, S.H., Larsen, P.J., Schmid, H.H.O., Hansen, H.S., 2006. Intestinal levels of anandamide and oleoylethanolamide in food-deprived rats are regulated through their precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761, 143–150.
- Pijnenburg, A.J.J., Honig, W.M.M., Van Der Heyden, J.A.M., Van Rossum, J.M., 1976. Effects of chemical stimulation of the mesolimbic dopamine system upon locomotor activity. *European Journal of Pharmacology* 35, 45–58.
- Pike, K.M., 1998. Long-term course of anorexia nervosa: Response, relapse, remission, and recovery. *Clinical Psychology Review* 18, 447–475.
- Piscitelli, F., Carta, G., Bisogno, T., Murru, E., Cordeddu, L., Berge, K., Tandy, S., Cohn, J.S., Griinari, M., Banni, S., Di Marzo, V., 2011. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutrition & Metabolism* 8, 51.
- Pisetsky, E.M., Chao, Y.M., Dierker, L.C., May, A.M., Striegel-Moore, R.H., 2008. Disordered eating and substance use in high-school students: results from the Youth Risk Behavior Surveillance System. *Int J Eat Disord* 41, 464–470.
- Ploog, D.W., Pirke, K.M., 1987. Psychobiology of anorexia nervosa. *Psychol Med* 17, 843–859.
- Pollak Dorocic, I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., Meletis, K., 2014. A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* 83, 663–678.
- Porte, D., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 2005. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54, 1264–1276.
- Powers, P.S., Santana, C., 2004. Available pharmacological treatments for anorexia nervosa. *Expert Opin Pharmacother* 5, 2287–2292.

- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., Maratos-Flier, E., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243–247.
- Rada, P., Avena, N.M., Hoebel, B.G., 2005. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* 134, 737–744.
- Ramírez-López, M.T., Vázquez, M., Bindila, L., Lomazzo, E., Hofmann, C., Blanco, R.N., Alén, F., Antón, M., Decara, J., Ouro, D., Orio, L., Suarez, J., Lutz, B., Rodríguez de Fonseca, F., Gómez de Heras, R., 2015. Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Pregestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring. *Front Behav Neurosci* 9, 339.
- Ranta, K., Väänänen, J., Fröjd, S., Isomaa, R., Kaltiala-Heino, R., Marttunen, M., 2017. Social phobia, depression and eating disorders during middle adolescence: longitudinal associations and treatment seeking. *Nord J Psychiatry* 71, 605–613.
- Ratnayake, W.M.N., Galli, C., 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann. Nutr. Metab.* 55, 8–43.
- Ratnovsky, Y., Neuman, P., 2011. The effect of pre-exposure and recovery type on activity-based anorexia in rats. *Appetite* 56, 567–576.
- Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., Soubrié, P., 2004. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, 640–648.
- Reuter, S.E., Martin, J.H., 2016. Pharmacokinetics of Cannabis in Cancer Cachexia-Anorexia Syndrome. *Clin Pharmacokinet* 55, 807–812.
- Richard, D., Baraboi, D., 2004. Circuitries involved in the control of energy homeostasis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Treat Endocrinol* 3, 269–277.
- Richardson, A.J., Puri, B.K., 2002. A randomized double-blind, placebo-controlled study of the effects of supplementation with highly unsaturated fatty acids on ADHD-related symptoms in children with specific learning difficulties. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 26, 233–239.
- Riederer, P., Toifl, K., Kruzik, P., 1982. Excretion of biogenic amine metabolites in anorexia nervosa. *Clin. Chim. Acta* 123, 27–32.
- Rindi, G., Savio, A., Torsello, A., Zoli, M., Locatelli, V., Cocchi, D., Paolotti, D., Solcia, E., 2002. Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem. Cell Biol.* 117, 521–525.

- Risé, P., Eligini, S., Ghezzi, S., Colli, S., Galli, C., 2007. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 76, 363–369.
- Risérus, U., 2008. Fatty acids and insulin sensitivity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 11, 100.
- Roh, E., Kim, M.S., 2016. Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol Metab (Seoul)* 31, 519–524.
- Rojo, L., Conesa, L., Bermudez, O., Livianos, L., 2006. Influence of Stress in the Onset of Eating Disorders: Data From a Two-Stage Epidemiologic Controlled Study. *Psychosomatic Medicine* 68, 628.
- Rolls, E.T., 2011. Taste, olfactory and food texture reward processing in the brain and obesity. *Int J Obes (Lond)* 35, 550–561.
- Ross, H.E., Young, L.J., 2009. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front Neuroendocrinol* 30, 534–547.
- Rothmund, Y., Preuschhof, C., Bohner, G., Bauknecht, H.-C., Klingebiel, R., Flor, H., Klapp, B.F., 2007. Differential activation of the dorsal striatum by high-calorie visual food stimuli in obese individuals. *NeuroImage* 37, 410–421.
- Routtenberg, A., 1968. “Self-starvation” of rats living in activity wheels: adaptation effects. *J Comp Physiol Psychol* 66, 234–238.
- Routtenberg, A., Kuznesof, A.W., 1967. Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. *J Comp Physiol Psychol* 64, 414–421.
- Rowland, N.E., Mukherjee, M., Robertson, K., 2001. Effects of the cannabinoid receptor antagonist SR 141716, alone and in combination with dexfenfluramine or naloxone, on food intake in rats. *Psychopharmacology* 159, 111–116.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., Allis, C.D., 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 983–994.
- Ruzickova, J., Rossmeisl, M., Prazak, T., Flachs, P., Sponarova, J., Vecka, M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., Kopecky, J., 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 39, 1177–1185.
- Sajdyk, T.J., Shekhar, A., Gehlert, D.R., 2004. Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. *Neuropeptides* 38, 225–234.

- Salamone, J.D., Correa, M., 2002. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioural Brain Research* 137, 3–25.
- Sam, A.H., Troke, R.C., Tan, T.M., Bewick, G.A., 2012. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63, 46–56.
- Sanchis-Segura, C., Cline, B.H., Marsicano, G., Lutz, B., Spanagel, R., 2004. Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 176, 223–232.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., Shimizu, K., 2011. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 278, 1598–1609.
- Schebendach, J.E., Mayer, L.E., Devlin, M.J., Attia, E., Contento, I.R., Wolf, R.L., Walsh, B.T., 2011. Food Choice and Diet Variety in Weight-Restored Patients with Anorexia Nervosa. *Journal of the American Dietetic Association* 111, 732–736.
- Scherma, M., Fattore, L., Castelli, M.P., Fratta, W., Fadda, P., 2014. The role of the endocannabinoid system in eating disorders: neurochemical and behavioural preclinical evidence. *Curr. Pharm. Des.* 20, 2089–2099.
- Scherma, M., Satta, V., Collu, R., Boi, M.F., Usai, P., Fratta, W., Fadda, P., 2017. Cannabinoid CB1 /CB2 receptor agonists attenuate hyperactivity and body weight loss in a rat model of activity-based anorexia. *Br. J. Pharmacol.* 174, 2682–2695.
- Scheurink, A.J.W., Boersma, G.J., Nergårdh, R., Södersten, P., 2010. Neurobiology of hyperactivity and reward: Agreeable restlessness in Anorexia Nervosa. *Physiology & Behavior, Proceedings from the 2009 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior* 100, 490–495.
- Schmitz, Y., Benoit-Marand, M., Gonon, F., Sulzer, D., 2003. Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J. Neurochem.* 87, 273–289.
- Schorr, M., Lawson, E.A., Dichtel, L.E., Klibanski, A., Miller, K.K., 2015. Cortisol Measures Across the Weight Spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 3313–3321.
- Schroeder, M., Eberlein, C., de Zwaan, M., Kornhuber, J., Bleich, S., Frieling, H., 2012. Lower levels of cannabinoid 1 receptor mRNA in female eating disorder patients: Association with wrist cutting as impulsive self-injurious behavior. *Psychoneuroendocrinology* 37, 2032–2036.
- Schultz, W., 2015. Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiological Reviews* 95, 853–951.
- Scott, J.M., Weir, D.G., 1998. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 5, 223–227.

- Sedlackova, D., Kopeckova, J., Papezova, H., Hainer, V., Kvasnickova, H., Hill, M., Nedvidkova, J., 2012. Comparison of a high-carbohydrate and high-protein breakfast effect on plasma ghrelin, obestatin, NPY and PYY levels in women with anorexia and bulimia nervosa. *Nutr Metab (Lond)* 9, 52.
- Selhub, J., 2002. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging* 6, 39–42.
- Shah, M., Vella, A., 2014. Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Rev Endocr Metab Disord* 15, 181–187.
- Shearer, G.C., Savinova, O.V., Harris, W.S., 2012. Fish oil — How does it reduce plasma triglycerides? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Triglyceride Metabolism and Disease* 1821, 843–851.
- Shih, P.-A.B., 2017. Integrating multi-omics biomarkers and postprandial metabolism to develop personalized treatment for anorexia nervosa. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 132, 69–76.
- Shih, P.B., Woodside, D.B., 2016. Contemporary views on the genetics of anorexia nervosa. *Eur Neuropsychopharmacol* 26, 663–673.
- Shih, P.B., Yang, J., Morisseau, C., German, J.B., Zeeland, A.A.S.-V., Armando, A.M., Quehenberger, O., Bergen, A.W., Magistretti, P., Berrettini, W., Halimi, K.A., Schork, N., Hammock, B.D., Kaye, W., 2016. Dysregulation of soluble epoxide hydrolase and lipidomic profiles in anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry* 21, 537–546.
- Shimizu, N., Oomura, Y., Kai, Y., 1989. Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiology & Behavior* 46, 835–841.
- Shrestha, Y.B., Wickwire, K., Giraud, S.Q., 2004. Action of MT-II on ghrelin-induced feeding in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport* 15, 1365–1367.
- Sihvola, E., Keski-Rahkonen, A., Dick, D.M., Hoek, H.W., Raevuori, A., Rose, R.J., Pulkkinen, L., Marttunen, M., Kaprio, J., 2009. Prospective associations of early-onset Axis I disorders with developing eating disorders. *Compr Psychiatry* 50, 20–25.
- Silvestri, C., Di Marzo, V., 2013. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 17, 475–490.
- Simansky, K.J., 1995. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behavioural Brain Research, Serotonin* 73, 37–42.
- Simopoulos, A.P., 2016. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* 8, 128.
- Sinha, M.K., Sturis, J., Ohannesian, J., Magosin, S., Stephens, T., Heiman, M.L., Polonsky, K.S., Caro, J.F., 1996. Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 733–738.

- Skibicka, K.P., Shirazi, R.H., Rabasa-Papio, C., Alvarez-Crespo, M., Neuber, C., Vogel, H., Dickson, S.L., 2013. Divergent circuitry underlying food reward and intake effects of ghrelin: dopaminergic VTA-accumbens projection mediates ghrelin's effect on food reward but not food intake. *Neuropharmacology* 73, 274–283.
- Skinner, E.R., Watt, C., Besson, J.A., Best, P.V., 1993. Differences in the fatty acid composition of the grey and white matter of different regions of the brains of patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Brain* 116 (Pt 3), 717–725.
- Small, D.M., 2006. Central Gustatory Processing in Humans. *Taste and Smell* 63, 191–220.
- Smink, F.R.E., van Hoeken, D., Hoek, H.W., 2012. Epidemiology of eating disorders: incidence, prevalence and mortality rates. *Curr Psychiatry Rep* 14, 406–414.
- Smink, F.R.E., van Hoeken, D., Hoek, H.W., 2013. Epidemiology, course, and outcome of eating disorders. *Curr Opin Psychiatry* 26, 543–548.
- Smith, G.P., Schneider, L.H., 1988. Relationships between Mesolimbic Dopamine Function and Eating Behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences* 537, 254–261.
- Sohn, J.-W., Elmquist, J.K., Williams, K.W., 2013. Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends in Neurosciences* 36, 504–512.
- Solenberger, S.E., 2001. Exercise and eating disorders: A 3-year inpatient hospital record analysis. *Eating Behaviors* 2, 151–168.
- Solinas, G., Borén, J., Dulloo, A.G., 2015. De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Molecular Metabolism* 4, 367–377.
- Solinas, M., Justinova, Z., Goldberg, S.R., Tanda, G., 2006. Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J. Neurochem.* 98, 408–419.
- Solomon, S.M., Kirby, D.F., 1990. The refeeding syndrome: a review. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 14, 90–97.
- Song, J.H., Fujimoto, K., Miyazawa, T., 2000. Polyunsaturated (n-3) Fatty Acids Susceptible to Peroxidation Are Increased in Plasma and Tissue Lipids of Rats Fed Docosahexaenoic Acid-Containing Oils. *J Nutr* 130, 3028–3033.
- Sørensen, L. b., Møller, P., Flint, A., Martens, M., Raben, A., 2003. Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 27, 1152.

- Soria-Gómez, E., Guzmán, K., Pech-Rueda, O., Montes-Rodríguez, C.J., Cisneros, M., Prospéro-García, O., 2010. Oleoylethanolamide affects food intake and sleep-waking cycle through a hypothalamic modulation. *Pharmacological Research* 61, 379–384.
- Soria-Gómez, E., Matias, I., Rueda-Orozco, P.E., Cisneros, M., Petrosino, S., Navarro, L., Di Marzo, V., Prospéro-García, O., 2007. Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br. J. Pharmacol.* 151, 1109–1116.
- Spano, P.F., Govoni, S., Trabucchi, M., 1978. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 19, 155–165.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Celebi, N., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Cegan, A., Elcnerova, M., Schleicher, E., Fritsche, A., Häring, H.-U., 2010. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* 33, 405–407.
- Stefanska, B., Karlic, H., Varga, F., Fabianowska-Majewska, K., Haslberger, A., 2012. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components--the implications in cancer prevention. *Br. J. Pharmacol.* 167, 279–297.
- Steinglass, J., Foerde, K., Kostro, K., Shohamy, D., Timothy Walsh, B., 2015. Restrictive Food Intake As A Choice – A Paradigm for Study. *Int J Eat Disord* 48, 59–66.
- Steinhausen, H.-C., 2002. The outcome of anorexia nervosa in the 20th century. *Am J Psychiatry* 159, 1284–1293.
- Stella, N., 2010. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58, 1017–1030.
- Stengel, A., Taché, Y.F., 2014. CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Front. Neurosci.* 8.
- Stevens, L., Zhang, W., Peck, L., Kuczek, T., Grevstad, N., Mahon, A., Zentall, S.S., Arnold, L.E., Burgess, J.R., 2003. EFA supplementation in children with inattention, hyperactivity, and other disruptive behaviors. *Lipids* 38, 1007–1021.
- Stice, E., Spoor, S., Bohon, C., Veldhuizen, M., Small, D., 2008. Relation of Reward from Food Intake and Anticipated Food Intake to Obesity: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *J Abnorm Psychol* 117, 924–935.
- Stoeckel, L.E., Weller, R.E., Cook, E.W., Twieg, D.B., Knowlton, R.C., Cox, J.E., 2008. Widespread reward-system activation in obese women in response to pictures of high-calorie foods. *NeuroImage* 41, 636–647.

- Stöger, R., 2006. In vivo methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics* 1, 155–162.
- Stoll, A.L., Severus, W.E., Freeman, M.P., Rueter, S., Zboyan, H.A., Diamond, E., Cress, K.K., Marangell, L.B., 1999. Omega 3 Fatty Acids in Bipolar Disorder: A Preliminary Double-blind, Placebo-Controlled Trial. *Arch Gen Psychiatry* 56, 407–412.
- Strober, M., Freeman, R., Morrell, W., 1997. The long-term course of severe anorexia nervosa in adolescents: Survival analysis of recovery, relapse, and outcome predictors over 10–15 years in a prospective study. *International Journal of Eating Disorders* 22, 339–360.
- Su, K.-P., Huang, S.-Y., Chiu, C.-C., Shen, W.W., 2003. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder: A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology* 13, 267–271.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97.
- Suglia, A., Chianese, R., Migliaccio, M., Ambrosino, C., Fasano, S., Pierantoni, R., Cobellis, G., Chioccarelli, T., 2016. Bisphenol A induces hypothalamic down-regulation of the the cannabinoid receptor 1 and anorexigenic effects in male mice. *Pharmacol. Res.* 113, 376–383.
- Sullivan, P.F., 1995. Mortality in anorexia nervosa. *Am J Psychiatry* 152, 1073–1074.
- Sumiyoshi, T., Higuchi, Y., Matsui, M., Arai, H., Takamiya, C., Meltzer, H.Y., Kurachi, M., 2007. Effective adjunctive use of tandospirone with perospirone for enhancing verbal memory and quality of life in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 965–967.
- Swanson, L.W., 1982. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin* 9, 321–353.
- Sweet, D.C., Levine, A.S., Billington, C.J., Kotz, C.M., 1999. Feeding response to central orexins. *Brain Res.* 821, 535–538.
- Swenne I, Rosling, A., Tengblad, S., Vessby, B., 2011. Omega-3 polyunsaturated essential fatty acids are associated with depression in adolescents with eating disorders and weight loss. *Acta Paediatrica* 100,
- Swenne, I., Rosling, A., 2012. Omega-3 essential fatty acid status is improved during nutritional rehabilitation of adolescent girls with eating disorders and weight loss. *Acta Paediatrica* 101, 858–861.

- Szczypka, M.S., Kwok, K., Brot, M.D., Marck, B.T., Matsumoto, A.M., Donahue, B.A., Palmiter, R.D., 2001. Dopamine Production in the Caudate Putamen Restores Feeding in Dopamine-Deficient Mice. *Neuron* 30,
- Takeda, H., Tsuji, M., Hayashi, M., Yamada, T., Matsumiya, T., Koizumi, M., Kimura, S., 2003. Pathophysiologic characteristics of the activity-stress paradigm in animal models: inhibitory effect of glucose on these responses. *Nutr. Rev.* 61, S75-79.
- Tam, J., Hinden, L., Drori, A., Udi, S., Azar, S., Baraghithy, S., 2018. The therapeutic potential of targeting the peripheral endocannabinoid/CB1receptor system. *Eur. J. Intern. Med.* 49, 23–29.
- Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., Strack, A.M., Lowenstein, D.H., Dallman, M.F., Julius, D., 1995. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Nature* 374, 542–546.
- Terrazzino, S., Berto, F., Carbonare, M.D., Fabris, M., Guiotto, A., Bernardini, D., Leon, A., 2004. Stearoyl-ethanolamide exerts anorexic effects in mice via down-regulation of liver stearoyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression. *The FASEB Journal* 18, 1580–1582.
- Thabuis, C., Destailats, F., Landrier, J.-F., Tissot-Favre, D., Martin, J.-C., 2010. Analysis of gene expression pattern reveals potential targets of dietary oleoylethanolamide in reducing body fat gain in C3H mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 922–928.
- Thim, L., Kristensen, P., Larsen, P.J., Wulff, B.S., 1998. CART, a new anorectic peptide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1281–1284.
- Thomas, J., Thomas, C.J., Radcliffe, J., Itsiopoulos, C., 2015. Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int* 2015, 172801.
- Thornton, L.M., Dellava, J.E., Root, T.L., Lichtenstein, P., Bulik, C.M., 2011. Anorexia nervosa and generalized anxiety disorder: further explorations of the relation between anxiety and body mass index. *J Anxiety Disord* 25, 727–730.
- Thorsdottir, I., Tomasson, H., Gunnarsdottir, I., Gisladdottir, E., Kiely, M., Parra, M.D., Bandarra, N.M., Schaafsma, G., Martínéz, J.A., 2007. Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. *International Journal of Obesity* 31, 1560–1566.
- Tian, W., Zhao, M., Li, M., Song, T., Zhang, M., Quan, L., Li, S., Sun, Z.S., 2012. Reversal of cocaine-conditioned place preference through methyl supplementation in mice: altering global DNA methylation in the prefrontal cortex. *PLoS ONE* 7, e33435.

- Tomasik, P.J., Sztefko, K., Starzyk, J., 2004. Cholecystokinin, glucose dependent insulinotropic peptide and glucagon-like peptide 1 secretion in children with anorexia nervosa and simple obesity. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 17, 1623–1631.
- Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M.S., Shimbara, T., Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M., 2003. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144, 1506–1512.
- Treasure, J., Macare, C., Mentxaka, I.O., Harrison, A., n.d. The use of a vodcast to support eating and reduce anxiety in people with eating disorder: A case series. *European Eating Disorders Review* 18, 515–521.
- Tremolizzo, L., Conti, E., Bomba, M., Uccellini, O., Rossi, M.S., Marfone, M., Corbetta, F., Santarone, M.E., Raggi, M.E., Neri, F., Ferrarese, C., Nacinovich, R., 2014. Decreased whole-blood global DNA methylation is related to serum hormones in anorexia nervosa adolescents. *The World Journal of Biological Psychiatry* 15, 327–333.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.
- Turcotte, C., Chouinard, F., Lefebvre, J.S., Flamand, N., 2015. Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites. *J. Leukoc. Biol.* 97, 1049–1070.
- Ungerstedt, U., n.d. Stereotaxic Mapping of the Monoamine Pathways in the Rat Brain*. *Acta Physiologica Scandinavica* 82, 1–48.
- Usdan, L.S., Khaodhiar, L., Apovian, C.M., 2008. The endocrinopathies of anorexia nervosa. *Endocr Pract* 14, 1055–1063.
- Vachier, I., Chanez, P., Bonnans, C., Godard, P., Bousquet, J., Chavis, C., 2002. Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 219–224.
- Van Binsbergen C.J., Odink J., Van der Beek E.J., Westenberg H.M., Bennink H.J. 1991. Biogenic amines in anorexia nervosa: circadian rhythm in urinary excretion and influence of posture and physical task load on plasma catecholamines. *Psychosom Med.* 53(4):440-52.
- van Deursen, D., van Leeuwen, M., Akdogan, D., Adams, H., Jansen, H., Verhoeven, A.J.M., 2009. Activation of hepatic lipase expression by oleic acid: possible involvement of USF1. *Nutrients* 1, 133–147.
- van Elburg, A.A., Kas, M.J.H., Hillebrand, J.J.G., Eijkemans, R.J.C., van Engeland, H., 2007. The impact of hyperactivity and leptin on recovery from anorexia nervosa. *J Neural Transm (Vienna)* 114, 1233–1237.

- Vandereycken, W., 1984. Neuroleptics in the short-term treatment of anorexia nervosa. A double-blind placebo-controlled study with sulpiride. *Br J Psychiatry* 144, 288–292.
- Vanhees, K., Vonhögen, I.G.C., van Schooten, F.J., Godschalk, R.W.L., 2014. You are what you eat, and so are your children: the impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 271–285.
- Verty, A.N.A., Boon, W.M., Mallet, P.E., McGregor, I.S., Oldfield, B.J., 2009. Involvement of hypothalamic peptides in the anorectic action of the CB receptor antagonist rimonabant (SR 141716). *Eur. J. Neurosci.* 29, 2207–2216.
- Verty, A.N.A., Evetts, M.J., Crouch, G.J., McGregor, I.S., Stefanidis, A., Oldfield, B.J., 2011. The cannabinoid receptor agonist THC attenuates weight loss in a rodent model of activity-based anorexia. *Neuropsychopharmacology* 36, 1349–1358.
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Telang, F., 2008. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 363, 3191–3200.
- Volkow, N.D., Wise, R.A., Baler, R., 2017. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 741–752.
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., Lowell, B.B., 2011. Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron* 71, 142–154.
- Vootla, V.R., Daniel, M., 2015. Abnormal Liver Function Tests in an Anorexia Nervosa Patient and an Atypical Manifestation of Refeeding Syndrome. *Case Rep Gastroenterol* 9, 261–265.
- Vucetic, Z., Reyes, T.M., n.d. Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2, 577–593.
- Walsh, B.T., Hadigan, C.M., Devlin, M.J., Gladis, M., Roose, S.P., 1991. Long-term outcome of antidepressant treatment for bulimia nervosa. *Am J Psychiatry* 148, 1206–1212.
- Wang, G.-J., Volkow, N.D., Fowler, J.S., 2002. The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 6, 601–609.
- Warensjö, E., Rosell, M., Hellenius, M.-L., Vessby, B., De Faire, U., Risérus, U., 2009. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids in Health and Disease* 8, 37.

- Waterland, R.A., 2006. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J. Nutr.* 136, 1706S-1710S.
- Wellman, P.J., 2005. Modulation of Eating by Central Catecholamine Systems [WWW Document].
- Weltens, N., Zhao, D., Van Oudenhove, L., 2014. Where is the comfort in comfort foods? Mechanisms linking fat signaling, reward, and emotion. *Neurogastroenterology And Motility: The Official Journal Of The European Gastrointestinal Motility Society* 26, 303–315.
- Weltzin, T.E., Bulik, C.M., McConaha, C.W., Kaye, W.H., 1995. Laxative withdrawal and anxiety in bulimia nervosa. *Int J Eat Disord* 17, 141–146.
- Wentz, E., Gillberg, C., Gillberg, I.C., Råstam, M., 2001. Ten-year follow-up of adolescent-onset anorexia nervosa: psychiatric disorders and overall functioning scales. *J Child Psychol Psychiatry* 42, 613–622.
- Werme, M., Lindholm, S., Thorén, P., Franck, J., Brené, S., 2002. Running increases ethanol preference. *Behavioural Brain Research* 133, 301–308.
- Werme, M., Thorén, P., Olson, L., Brené, S., 2000. Running and cocaine both upregulate dynorphin mRNA in medial caudate putamen. *European Journal of Neuroscience* 12, 2967–2974.
- Westmoreland, P., Krantz, M.J., Mehler, P.S., 2016. Medical Complications of Anorexia Nervosa and Bulimia. *Am. J. Med.* 129, 30–37.
- Williams, C.M., Kirkham, T.C., 1999. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 143, 315–317.
- Williams, C.M., Rogers, P.J., Kirkham, T.C., 1998. Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol. Behav.* 65, 343–346.
- Williams, D.L., Cummings, D.E., Grill, H.J., Kaplan, J.M., 2003. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 144, 2765–2767.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., Liu, X.H., 2001. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.* 74, 683–701.
- Winston, A.P., 2012. The clinical biochemistry of anorexia nervosa. *Ann. Clin. Biochem.* 49, 132–143.
- Wise, R.A., 2009. Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends in Neurosciences* 32, 517–524.

- Wood, J.T., Williams, J.S., Pandarinathan, L., Janero, D.R., Lammi-Keefe, C.J., Makriyannis, A., 2010. Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma. *J. Lipid Res.* jlr.M002436.
- Woods, S.C., Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Seeley, R.J., 2000. Food Intake and the Regulation of Body Weight. *Annual Review of Psychology* 51, 255–277.
- Wu, C.-L., Doong, M.-L., Wang, P.S., 2008. Involvement of cholecystokinin receptor in the inhibition of gastrointestinal motility by oxytocin in ovariectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 580, 407–415.
- Xu, G., Zhu, F., Liu, C., Li, H., Shi, M., 2005. Study on serum leptin level of urban resident and the relationship between body mass index, blood lipid, insulin and leptin level. *Wei Sheng Yan Jiu* 34, 205–207.
- Xu, X., So, J.-S., Park, J.-G., Lee, A.-H., 2013. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin. Liver Dis.* 33, 301–311.
- Yager, L.M., Garcia, A.F., Wunsch, A.M., Ferguson, S.M., 2015. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience* 301, 529–541.
- Yamashita, M., Takayanagi, Y., Yoshida, M., Nishimori, K., Kusama, M., Onaka, T., 2013. Involvement of prolactin-releasing peptide in the activation of oxytocin neurones in response to food intake. *J. Neuroendocrinol.* 25, 455–465.
- Yang, J., Shih, P.B., 2018. Fasting and postprandial soluble epoxide hydrolase-associated eicosanoids of remitted patients with eating disorder. *Data in Brief* 17, 334–338.
- Yang, Q., 2010. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. *Yale J Biol Med* 83, 101–108.
- Yang, Y., Chen, M., Georgeson, K.E., Harmon, C.M., 2007. Mechanism of oleoylethanolamide on fatty acid uptake in small intestine after food intake and body weight reduction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292, R235–R241.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Mostofsky, D.I., 2005. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. *Neurobiol. Aging* 26 Suppl 1, 98–102.
- Yilmaz, Z., Kaplan, A.S., Tiwari, A.K., Levitan, R.D., Piran, S., Bergen, A.W., Kaye, W.H., Hakonarson, H., Wang, K., Berrettini, W.H., Brandt, H.A., Bulik, C.M., Crawford, S., Crow, S., Fichter, M.M., Halmi, K.A., Johnson, C.L., Keel, P.K., Klump, K.L., Magistretti, P., Mitchell, J.E., Strober, M., Thornton, L.M., Treasure, J., Woodside, D.B., Knight, J., Kennedy, J.L., 2014. The role of leptin, melanocortin, and neurotrophin system genes on body weight in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Psychiatr Res* 55, 77–86.

- Yui, K., Koshihara, M., Nakamura, S., Kobayashi, Y., 2012. Effects of Large Doses of Arachidonic Acid Added to Docosahexaenoic Acid on Social Impairment in Individuals With Autism Spectrum Disorders: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 32, 200.
- Zaider, T.I., Johnson, J.G., Cockell, S.J., 2002. Psychiatric Disorders Associated with the Onset and Persistence of Bulimia Nervosa and Binge Eating Disorder During Adolescence. *Journal of Youth and Adolescence* 31, 319–329.
- Zák, A., Vecka, M., Tvrzická, E., Hrubý, M., Novák, F., Papezová, H., Lubanda, H., Veselá, L., Stanková, B., 2005. Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. *Physiol Res* 54, 443–451.
- Zgheib, S., Méquinion, M., Lucas, S., Leterme, D., Ghali, O., Tolle, V., Zizzari, P., Bellefontaine, N., Legroux-Gérot, I., Hardouin, P., Broux, O., Viltart, O., Chauveau, C., 2014. Long-term physiological alterations and recovery in a mouse model of separation associated with time-restricted feeding: a tool to study anorexia nervosa related consequences. *PLoS ONE* 9, e103775.
- Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M., Dimarchi, R., 2005. Leptin: structure, function and biology. *Vitam. Horm.* 71, 345–372.
- Zhang, G., Cai, D., 2011. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E1004-1012.
- Zhang, X.A., Martin, T.F.J., 2018. High Throughput NPY-Venus and Serotonin Secretion Assays for Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. *Bio Protoc* 8.
- Zhou, Q.Y., Palmiter, R.D., 1995. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83, 1197–1209.
- Zhou, Y., Kreek, M.J., 2015. Persistent increases in rat hypothalamic POMC gene expression following chronic withdrawal from chronic “binge” pattern escalating-dose, but not steady-dose, cocaine. *Neuroscience* 289, 63–70.
- Zhu, B., Liu, S., Liu, J., Wan, F., 2002. Effect of serum leptin on nutritional status of patients with cancer. *Wei Sheng Yan Jiu* 31, 100–102.
- Zunker, C., Mitchell, J.E., Wonderlich, S.A., n.d. Exercise interventions for women with anorexia nervosa: A review of the literature. *International Journal of Eating Disorders* 44, 579–584.
- Zwanzger, P., Domschke, K., Bradwejn, J., 2012. Neuronal network of panic disorder: the role of the neuropeptide cholecystokinin. *Depress Anxiety* 29, 762–774.

6 Sitografia

www.dallegrove.it/quinta-edizione-del-diagnostic-and-statistical-manual-of-mental-disorders-dsm-5-quali-sono-le-novita-riguardanti-i-disturbi-della-nutrizione-e-dell'alimentazione

www.ghrelinafisio.blogspot.com

www.ingentaconnect.com

www.kalapa-clinic.com