



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Corso di dottorato in NEUROSCIENZE

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Ciclo XXVI

Possibile ruolo del sistema endocannabinoide nel disturbo d'alimentazione incontrollata (binge eating disorder): studi comportamentali, farmacologici e biochimici

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/14- FARMACOLOGIA

Presentata da:

Valentina Satta

Coordinatore Dottorato

Prof Walter Fratta

Tutor/Relatore

Prof Walter Fratta

Esame finale anno accademico 2012 – 2013

INDICE

INTRODUZIONE	pag.1
Regolazione del comportamento alimentare	pag.1
BINGE EATING DISORDER	pag.10
Criteri diagnostici	pag.10
Epidemiologia	pag.13
Complicanze organiche	pag.13
Comorbidità psichiatrica	pag.14
Fattori di rischio ed eziopatogenesi	pag.15
Terapia	pag.19
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	pag.23
Cenni storici	pag.23
Composizione chimica	pag.24
I recettori CB ₁ e CB ₂	pag.26
I cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi	pag.30
Metabolismo degli endocannabinoidi	pag.32
Effetti fisiologici e farmacologici degli endocannabinoidi	pag.37
Ruolo del sistema endocannabinoide nel BED	pag.46
Modelli animali di BED	pag.48
OBIETTIVI DELLO STUDIO	pag.50
MATERIALI E METODI	pag.54
Animali	pag.54
Tipologia di dieta	pag.54
Induzione del comportamento di binge eating	pag.54
Farmaci	pag.55
Analisi comportamentale	pag.56
Studi di binding	pag.61
Analisi statistica	pag.63
RISULTATI	pag.64
Induzione del comportamento di binge eating	pag.64
Studi Comportamentali	pag.66
Studi Farmacologici	pag.73
Studi Biochimici	pag.85

DISCUSSIONE
CONCLUSIONI
BIBLIOGRAFIA

pag. 89

pag. 99

pag.100

INTRODUZIONE

Per definizione, un disturbo del comportamento alimentare (DCA) è: *“una persistente alterazione della condotta alimentare o di comportamenti finalizzati al controllo del peso corporeo e della forma fisica che danneggiano significativamente la salute fisica o il funzionamento psicologico e che non sono secondari a nessuna condizione medica o psichiatrica conosciuta”* (Faiburn et al., 2003). Nell’ultimo ventennio, i disturbi del comportamento alimentare (DCA), nelle loro svariate forme diversificate e complesse, hanno assunto l’entità di una vera e propria emergenza sociale a causa degli effetti deleteri che esercitano sulla salute degli individui che ne sono affetti. Secondo alcuni autori, nella società industrializzata, l’elevata diffusione di tali patologie è diventato un fenomeno in crescente espansione, mentre secondo altri, la loro aumentata incidenza dipenderebbe semplicemente da una migliore conoscenza delle patologie alimentari ed ad un numero sempre maggiore di diagnosi corrette. Dati epidemiologici suggeriscono che questi disturbi insorgono non solo in età adolescenziale ma anche in quella adulta oltre che mettere in evidenza un crescente numero di casi in età pre-adolescenziale. Nonostante negli ultimi anni siano stati compiuti notevoli progressi concernenti lo studio dei meccanismi neurobiologici che sottendono a tali disturbi, dei fattori di rischio, della gestione clinico-terapeutica, l’eziopatologia dei DCA rimane ancora da chiarire. Inoltre, non essendoci farmaci disponibili per il loro trattamento, l’individuazione di target molecolari per lo sviluppo di strategie farmacologiche per la terapia di supporto assume un ruolo di primaria importanza.

Regolazione del comportamento alimentare

Nel comportamento alimentare è importante distinguere le variabili che stanno alla base dell’inizio e della fine di un pasto: esse sono la fame, l’appetito e la sazietà. La fame è identificata come il bisogno fisiologico di mangiare senza però essere vincolato ad un alimento in particolare. Lo

stimolo della fame è una sensazione innata che porta l'individuo a consumare una quantità di cibo tale da sopprimere la sofferenza fisica (forti contrazioni gastriche) e mentale (nervosismo ed irritabilità) prodotta dalla mancanza di nutrimento e, permettendo, quindi all'organismo di ripristinare le proprie risorse soddisfacendo tale stimolo. L'appetito, invece, è per definizione il desiderio di assumere determinati cibi o pietanze dettato dal piacere prodotto senza necessariamente essere accompagnato da una sensazione di fame. La sazietà, invece, è una condizione che subentra in seguito all'assunzione di cibo portando l'individuo ad interrompere il pasto in seguito ad una sensazione di pienezza. Queste tre condizioni, interagendo l'una con l'altra caratterizzano il comportamento alimentare di tutti gli individui. Il controllo fisiologico dell'appetito, della fame e del senso di sazietà è regolato da un complesso sistema di segnali centrali e periferici che coinvolgono una serie di neurotrasmettitori e peptidi che, interagendo reciprocamente, stimolano o inibiscono il comportamento alimentare.

Componente omeostatica

A livello cerebrale, il ruolo chiave nella regolazione centrale del comportamento alimentare è svolto da un'area localizzata sotto il talamo, nella parte centrale dell'encefalo, chiamata ipotalamo. Esso è costituito da numerosi nuclei, collegati fra loro, ognuno dei quali coinvolto nell'omeostasi energetica attraverso una rete di connessioni anatomiche adibita al trasporto di segnali oreosizzanti ed anoressizzanti (Karla et al 1999). Già nel 1954, Teitelbaum e Stellar ipotizzarono che l'ipotalamo fosse la sede di due centri distinti, fondamentali nella regolazione della fame e della sazietà: il primo denominato "feeding center" (centro della fame), costituito dal nucleo dell'ipotalamo laterale (LH), la cui lesione nell'animale produceva un arresto nel consumo di cibo ed acqua causando un comportamento simil-anoressico; la sua stimolazione elettrica, invece, induceva un aumento del consumo degli stessi. Il secondo venne chiamato "saziety center" (centro di sazietà), ed è costituito dal nucleo ventromediale (VMN) e dal nucleo paraventricolare (PVN)

dell'ipotalamo, la cui lesione induceva iperfagia con il conseguente sviluppo di obesità e la sua stimolazione elettrica produceva un effetto opposto (Hetherington e Ranson 1942). L'ipotalamo è diviso in diversi nuclei con diverse funzioni: il nucleo arcuato (ARC), il nucleo ventro-mediale (VMN), l'ipotalamo laterale (LH), il nucleo dorso-mediale (DMN), nucleo paraventricolare (PVN), ipotalamo perifornicale e nucleo soprachiasmatico (Williams et al., 2001; Morton et al., 2006). Questi nuclei ipotalamici sono in stretta correlazione con numerose aree cerebrali (corteccia cerebrale, sistema limbico, sistema nervoso autonomo) e su di loro convergono, per poi essere smistati, segnali di diversa natura. Il nucleo arcuato è un nucleo dell'ipotalamo situato alla base del terzo ventricolo. Esso costituisce il centro d'elaborazione ed integrazione primaria dei segnali periferici di fame e/o di sazietà che, oltrepassando la barriera ematoencefalica, lo raggiungono ed agiscono sui neuroni presenti in questo nucleo (neuroni di primo ordine) (Funahashi et al., 2000). Una volta codificati, tali segnali generano una risposta che verrà poi inviata a differenti neuroni localizzati in altri nuclei ipotalamici (neuroni di second'ordine). Nel nucleo arcuato esistono due popolazioni di neuroni che esprimono differenti neuropeptidi: la prima è costituita da neuroni oressizzanti, che secernono il neuropeptide Y (NPY) e la proteina agouti-correlata (AgRP), la cui stimolazione determina un aumento dell'assunzione di cibo; la seconda invece comprende i neuroni anoressizzanti, che secernono la pro-opiomelanocortina (POMC) e il cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), la cui stimolazione inibisce l'assunzione di cibo. Queste due popolazioni di neuroni sono influenzate dai segnali di fame e di sazietà e tra di loro domina una relazione d'inibizione reciproca: quando una si attiva inibisce l'altra e viceversa. Il NPY è un neuropeptide di 36 aminoacidi appartenente alla famiglia dei polipeptidi pancreatici e tra le sue numerose funzioni, annovera quella di potente oressizzante stimolando efficacemente l'appetito (Parker et al., 2002). Somministrazioni intracerebroventricolari (icv) ripetute di NPY nel PVN ipotalamico determinano iperfagia ed un considerevole incremento del peso corporeo (Stanley et al., 1986). Inoltre la somministrazione diretta di NPY nel terzo ventricolo di ratto causa un persistente

aumento del consumo di cibo, effetto che si evidenzia anche dopo diversi giorni dalla sua somministrazione (Flynn et al., 1999). L'AgRP, è una proteina di 132 aminoacidi rilasciata dalle stesse terminazioni sinaptiche che secernono il NPY. L'AgRP determina una stimolazione dell'assunzione di cibo inibendo l'azione anoressizzante dell'ormone stimolante i melanociti α (α -MSH) in quanto agisce da antagonista endogeno dei recettori per melanocortina 3 e 4 (MC3 e MC4). La POMC è un pro-ormone che in seguito all'attività di una pro-convertasi, dà vita ad una serie di ormoni tra i quali la corticotropina (ACTH) dal quale deriva, in seguito ad ulteriori tagli proteolitici, l' α -MSH che, come detto precedentemente, è un potente inibitore dell'introito calorico ed agisce attraverso i recettori MC3 e MC4 (Kalra et al., 1999; Yang e Harmon, 2003). Il CART, denominato in tal modo in quanto i suoi livelli aumentano in seguito ad assunzione di cocaina e amfetamina, è un peptide coinvolto nei complessi meccanismi che regolano il comportamento alimentare, agendo, in particolare, da molecola anoressizzante (Kristensen et al., 1998). Anche nell'LH, che come detto precedentemente è un'area identificata come il "centro della fame", esistono due distinte popolazioni neuronali che sintetizzano peptidi oressizzanti, quali le orexine (ORXA e ORXB) e l'ormone concentrante la melanina (MCH) che stimolano l'appetito e riducono il metabolismo. I neuroni che secernono questi peptidi oressizzanti sono distribuiti in forma omogenea nell'ipotalamo laterale ed inviano i loro assoni a diverse strutture cerebrali implicate sia negli stati motivazionali, come ad esempio l'area ventrale del tegmento, che nel movimento. Inoltre questi neuroni ricevono le proiezioni degli assoni dei neuroni di primo ordine localizzati nel nucleo arcuato che ne regolano l'attività: i neuroni NPY/AgRP stimolano l'attività di questi neuroni mentre quelli CART, al contrario la inibiscono. Nel nucleo ventro-mediale dell'ipotalamo (VMN), identificato come il "centro della sazietà", ad oggi non sono stati identificati al suo interno neuroni che producono peptidi coinvolti nella regolazione dell'appetito, si ritiene pertanto che svolga il ruolo di freno inibitore sull'LH e che sia una stazione di rilascio delle fibre oressizzanti ed anoressizzanti del sistema di regolazione ipotalamico. Il nucleo paraventricolare (PVN) è di

rilevanza fondamentale nel rilascio di segnali oressigeni poiché secerne un'elevata quantità di neuropeptidi tra cui i più rilevanti sono l'ormone rilasciante la corticotropina (CRH) e l'ormone rilasciante la tireotropina (TRH) entrambi con attività anoressizzante. All'interno di questi due nuclei, il VMN e PVN, vengono espressi sia il recettore della melanocortina MC4 al quale, come già precedentemente descritto, si legano sia l' α -MSH che l'AgRP, che il recettore per il neuropeptide Y (Y1R). La sensazione di fame e sazietà sono fenomeni accoppiati con i comportamenti di attività/vigilanza nell'ambito dei cicli giorno-notte (nell'animale da esperimento l'espressione genica di segnali anoressizzanti è maggiormente ridotta durante la fase di buio quando è più attivo dal punto di vista motorio). La modulazione di questi circuiti centrali è il risultato di una complessa interazione tra segnali afferenti che nascono a livello periferico: tali segnali vengono distinti in segnali di fame e di sazietà. Tra i segnali di fame ritroviamo un ormone peptidico di 26 aminoacidi secreto dalle cellule ossintiche P/D1 dello stomaco e in misura minore anche dal pancreas: la ghrelina (GH releasin). Essa è stata identificata da Kojima e collaboratori nel 1999 ed è implicata nel rilascio dell'ormone della crescita oltre che nel comportamento alimentare. E' stato evidenziato che i livelli ematici di tale peptide aumentano notevolmente prima dell'inizio di ogni pasto e si riducono drasticamente nella fase post-prandiale, evidenziando così un suo ruolo chiave nell'inizio dell'assunzione di cibo. La ghrelina, una volta prodotta, tramite il circolo ematico raggiunge il nucleo arcuato dove interagisce con i propri recettori GHS-R localizzati sui neuroni rilascianti NPY/AgRP, attivandoli (Kamegai et al., 2001). Questa attivazione porta ad un rilascio di NPY e AgRP (oressizzanti), che stimolano da una parte il PVN implicato nelle funzioni metaboliche e dall'altra inducono il rilascio di MCH ed orexina da parte dell' LH. Il risultato finale sarà quello dell'aumento del consumo di cibo e della riduzione del metabolismo. In contrapposizione ai segnali di fame, il nostro organismo produce dei segnali di sazietà che sono mediati da leptina ed insulina. La leptina è prodotta dal tessuto adiposo in quantità proporzionali alla disponibilità delle riserve energetiche. Essa, agendo sui propri recettori OB-R, localizzati sulle

due popolazioni di neuroni presenti nell'ARC diminuisce l'attività dei AgRP/NPY inibendo così l'azione stimolante che essi hanno nei confronti dell'MCH e dell'orexina ed aumenta l'attività dei neuroni secernenti POMC/CART ad azione anoressizzante. L'insulina, ormone della sazietà, è un ormone peptidico prodotto dal pancreas: agisce a livello centrale sui propri recettori localizzati nei vari nuclei ipotalamici. Quindi, quest'ormone, oltre che regolare il metabolismo del glucosio è implicata anche nell'assunzione di cibo attenuando la fame. Questa rete neuronale è responsabile del controllo a lungo termine del bilancio energetico e ha lo scopo di garantire la stabilità del peso corporeo. Molti altri peptidi prodotti dall'intestino influenzano il comportamento alimentare agendo, sia a livello periferico che centrale, come segnali di sazietà. Tra i più conosciuti annoveriamo la colecistochinina (CCK), il peptide YY₃₋₃₆ (PYY), e il Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1). La CCK fu tra i primi ormoni intestinali per il quale fu descritto l'effetto inibitore del consumo di cibo nei roditori (Smith and Gibbs, 1985). Viene secreta dal duodeno e dal digiuno (anche se in minor quantità) in risposta alla presenza di lipidi. Essa provoca la contrazione della cistifellea con il conseguente rilascio di bile nel duodeno che scinde i lipidi in piccole particelle facilmente assorbibili ed, inoltre, stimola la secrezione di insulina a livello del pancreas; tramite stimolazione vagale determina il senso di sazietà. La CCK agisce su due sottotipi di recettori CCK che sono ampiamente distribuiti sia a livello periferico che a livello centrale. Il PYY è un peptide di 36 aminoacidi secreto dalle cellule L dell'intestino tenue dopo l'ingestione di cibo. Questo peptide esercita il suo effetto anoressizzante agendo sui recettori Y2 a livello ipotalamico, sopprimendo, quindi, l'effetto oressizzante del NPY e contrastando l'azione della ghrelina (Konturek et al., 2004; Hellstrom et al., 2004). Il GLP-1 è un peptide di 30 aminoacidi secreto anch'esso dalle cellule L dell'intestino tenue (Neary et al., 2004). Anche questo peptide riduce il consumo di cibo andando ad antagonizzare l'effetto del NPY (Turton et al., 1996).

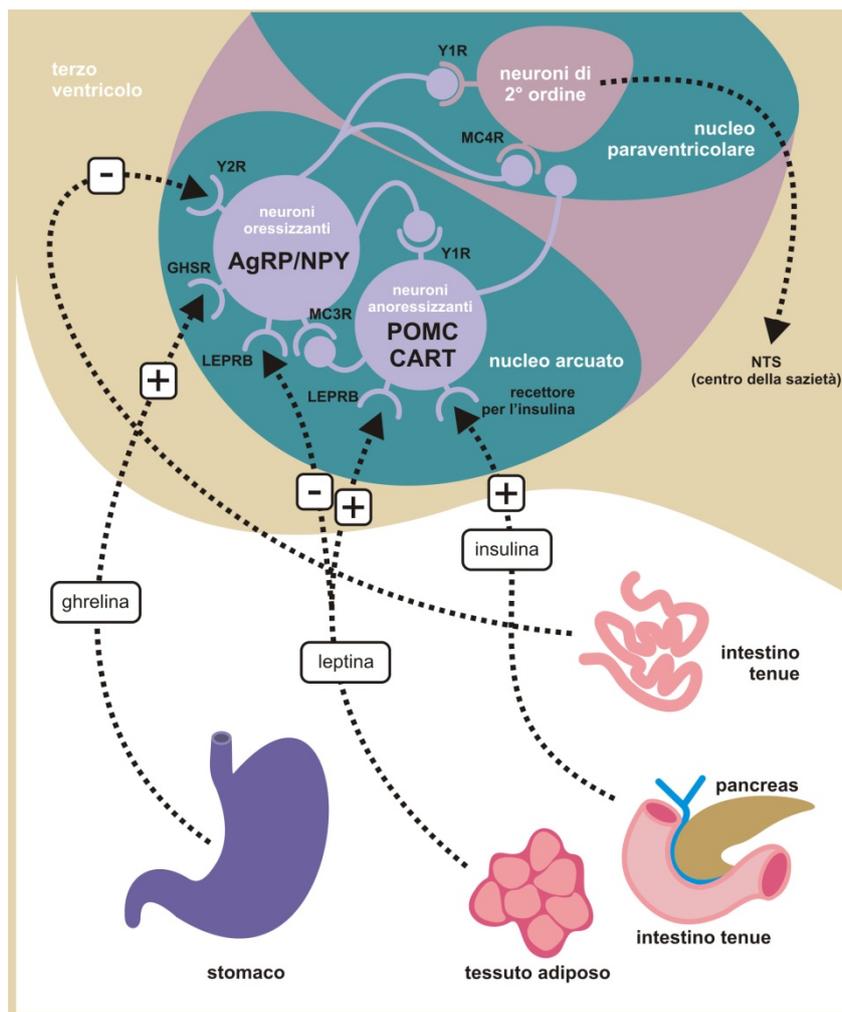


Fig 1.: rappresentazione schematica del controllo ipotalamico del bilancio energetico

Componente edonica

Il comportamento alimentare aiuta a mantenere l'equilibrio energetico ed è necessario per la sopravvivenza di ogni specie ed individuo: capita però che, se si consumano cibi ad elevato apporto calorico ed altamente palatabili, questa condotta possa diventare piacevole tanto da portare l'individuo a cercare e prolungare il contatto con questi stimoli gratificanti a prescindere da quelle che sono le esigenze nutrizionali dell'organismo. Il cibo, quindi, possiede delle proprietà definite di rinforzo positivo che stanno alla base del comportamento motivato. In tale comportamento si possono riscontrare la fase anticipatoria caratterizzata dal raggiungimento dello stimolo, la fase

consumatoria dove lo stimolo viene consumato e la fase post-consumatoria nella quale subentra la sazietà e quindi la soddisfazione del consumo dello stimolo stesso che nel nostro caso specifico è il cibo. Come affermato poc'anzi, il cibo come tutti gli stimoli gratificanti naturali possiede sia proprietà incentive come l'odore, la forma e il gusto che permettono all'individuo l'attivazione della ricerca e del contatto con lo stimolo, che proprietà funzionali intese come l'apporto calorico e metabolico di un cibo importanti per l'efficacia biologica e fisiologica dello stesso. E' ovvio che, affinché il cibo espleti le sue funzioni di rinforzo positivo, debba interagire con delle specifiche aree cerebrali che producano come risultato ultimo la sensazione gratificante. Ad oggi il sistema dopaminergico meso-cortico- limbico è il più importante tra i circuiti della ricompensa e della gratificazione cerebrale ed è coinvolto nella genesi delle emozioni e nei processi di memoria ed apprendimento. Di fatto, per ciò che riguarda il comportamento alimentare, questo sistema è tra i principali che mediano le proprietà edoniche del cibo (Mey e Adan 2014). I neuroni dopaminergici di questo sistema hanno origine nell'area ventrale del tegmento (VTA) e proiettano a diverse regioni del proencefalo, inclusi il nucleo accumbens (NAcc), la corteccia prefrontale, il globus pallido ventrale, l'amigdala e l'ippocampo (Wise e Rompre, 1989; Wise, 2009; Fields et al 2007). È stato ampiamente dimostrato che il cibo altamente palatabile stimola il sistema dopaminergico mesolimbico aumentando il rilascio di dopamina nella shell del nucleus accumbens (Martel e Fantino, 1996; Bassareo e Di Chiara 1997). Il nucleus accumbens rappresenta il centro di integrazione dei segnali derivanti dal sistema limbico, ed informa le altre aree cerebrali del grado di piacere prodotto da quello stimolo. La possibilità che l'individuo memorizzi e ripeta l'azione è direttamente proporzionale al livello di gratificazione che tale azione produce. È importante sottolineare il fatto che il sistema mesolimbico è in stretta connessione con l'ipotalamo: molte delle molecole che agiscono a livello ipotalamico per la regolazione della componente omeostatica del consumo di cibo sono presenti anche a livello del sistema mesolimbico dove giocano un ruolo importante nella sua componente edonica (Kelley et al., 2005; Monteleone e Maj, 2013; Mey e

Adan 2014). Ad esempio, sui neuroni dopaminergici della VTA sono espressi sia i recettori GH-R per la ghrelina che i recettori OB-R per la leptina. Studi animali hanno dimostrato che l'attivazione dei GH-R determina un aumento del firing di questi neuroni e porta ad un aumento del rilascio di dopamina nella shell del NAcc (Abizaid et al., 2006; Jerlbag et al., 2012). Inoltre, l'aumento del segnale mediato dalla ghrelina a livello della VTA determina sia un aumento dell'assunzione di cibo altamente palatabile che della motivazione per l'ottenimento di una soluzione contenente sucrosio (Egecioglu et al., 2010; Skibicka et al., 2011). Al contrario, l'attivazione dei recettori OB-R determina una diminuzione delle proprietà incentive del cibo (Figlewicz et al., 2006). Sempre sui neuroni dopaminergici della VTA, sono espressi sia i recettori per l'orexina che per il NPY. L'attivazione di entrambi determina un aumento del rilascio di dopamina a livello del NAcc (Korotkova et al., 2006; Narita et al., 2006).

BINGE EATING DISORDER (BED)

La classificazione dei disturbi alimentari presente nella terza edizione del *Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali* (DSM-III del 1980 e DSM-III-R del 1987), faceva riferimento solamente ad anoressia nervosa (AN) e bulimia nervosa (BN). Nel 1994, nella quarta edizione del manuale (DSM-IV), a tale classificazione fu aggiunta la categoria dei disturbi del comportamento alimentare non altrimenti specificati (DANAS), che comprendeva tutti quei disturbi che pur essendo clinicamente significativi, non rientravano nei criteri diagnostici dell'anoressia nervosa e della bulimia nervosa. Di questa categoria faceva parte il Binge Eating Disorder (BED) o sindrome d'alimentazione incontrollata. Nonostante il suo inquadramento diagnostico e clinico sia avvenuto in epoca relativamente recente, le caratteristiche che delineano il BED apparivano già descritte in dettaglio in un articolo dello psichiatra statunitense Albert Stunkard del 1959 (Stunkard et al., 1959). Egli descriveva tale disturbo come "sindrome del mangiare smodato": in pazienti obesi si evidenziavano periodici episodi di sovralimentazione, caratterizzati dall'assunzione di elevate quantità di cibo in brevi periodi di tempo, durante le quali i soggetti perdevano il controllo sul cibo con conseguenti sensi di colpa. Nell'ultima revisione di tale manuale, il DSM-V del 2013, il BED ha subito una grande modifica: da disturbo alimentare inserito in Appendice B, come disturbo i cui criteri diagnostici richiedevano ulteriori studi e approfondimenti (Wilfley et al., 2003) ottiene finalmente una collocazione nosografica definitiva ed è quindi classificato come disturbo alimentare vero e proprio al pari dell'AN e BN.

Criteri diagnostici

I criteri diagnostici per il BED secondo il DSM-V sono:

CRITERIO A: Episodi ricorrenti di alimentazione incontrollata. Un episodio di alimentazione incontrollata è caratterizzata dalla presenza degli elementi sottoriportati:

- mangiare in un periodo di tempo definito (circa 2 ore), un quantitativo di cibo chiaramente più abbondante di quello che la maggior parte delle persone mangerebbe in un simile intervallo di tempo ed in circostanze simili;
- sensazione di perdita del controllo nel mangiare durante l'episodio (sensazione di non riuscire a fermarsi e/o controllare che cosa e quanto si sta mangiando).

CRITERIO B: gli episodi di alimentazione incontrollata sono associati a tre (o più) dei seguenti sintomi:

- Mangiare molto più rapidamente del normale
- Mangiare fino a sentirsi spiacevolmente pieni
- Mangiare grandi quantitativi di cibo anche se non ci si sente fisicamente affamati
- Mangiare da soli a causa dell'imbarazzo per quanto si sta mangiando
- Sentirsi disgustato verso sé stesso, depresso, o molto in colpa dopo le abbuffate.

CRITERIO C: è presente marcato disagio a riguardo del mangiare incontrollato.

CRITERIO D: il comportamento alimentare incontrollato si manifesta, mediamente, almeno una volta a settimana nell'arco di 3 mesi.

CRITERIO E: l'alimentazione incontrollata non risulta associata con l'utilizzo sistematico di comportamenti compensatori inappropriati (uso di purganti, digiuno, eccessivo esercizio fisico), e non si verifica esclusivamente in corso di AN o di BN.

Il livello minimo di gravità è basato sulla frequenza delle abbuffate (vedi sotto). Il livello di gravità può essere aumentato tenendo conto degli altri sintomi e del grado di disabilità funzionale. Esso si distingue in:

- Lieve: 1-3 crisi bulimiche per settimana
- Moderato: 4-7 crisi bulimiche per settimana
- Grave: 8-13 crisi bulimiche per settimana
- Estremo: 14 o più crisi bulimiche per settimana

I cibi consumati durante le abbuffate sono tipicamente ad alto contenuto calorico (grassi e/o zuccheri) mentre negli altri giorni la preferenza è orientata verso alimenti ricchi di fibre e proteine (Yanovsky et al., 1992; Yanovsky et al., 1994; Dingemans et al., 2002). Dato che nel BED la abbuffate non sono seguite da regolari pratiche compensatorie, l'effetto collaterale più immediato è un aumento del peso corporeo che, nella maggior parte dei soggetti, porta allo sviluppo di una condizione di obesità. Di fatto, il 42% degli individui affetti da BED presentano una condizione d'obesità (definita attraverso l'indice di massa corporea [BMI] ≥ 30 mg/kg²): all'interno di questa percentuale il 15% presenta, addirittura, un BMI ≥ 40 mg/kg². Capita, però, che in alcuni pazienti affetti da BED si evidenzia una lieve tendenza a controbilanciare le grandi quantità di cibo ingerite durante questi episodi (Wonderlich et al., 2007; Guss et al., 1994): la mancanza di sistematicità in tali interventi differenzia i soggetti con il BED dai soggetti bulimici o da anoressiche binge/purge (Masheb et al., 2006). Il tema predominante nel BED è la perdita di controllo nei confronti del cibo che porta i soggetti affetti da tale disturbo a provare un senso di inadeguatezza ed impotenza derivato da una persistente bassa autostima (Todisco et al., 2008). L'alimentazione compulsiva è accompagnata nella sua immediatezza, da emozioni e sentimenti positivi come per esempio una riduzione dell'ansia e della fame, sentendosi così sollevati. Successivamente tali sentimenti positivi lasciano spazio a quelli negativi: la stessa ansia che si era attenuata con l'avvento delle abbuffate, si ripresenta più marcata di prima con annessi anche agitazione, depressione, disgusto, vergogna e senso di colpa per l'abbuffata appena terminata oltre che a sensazioni fisiche di stanchezza, mal di stomaco o sonnolenza improvvisa. Infatti, l'atteggiamento dei soggetti affetti da BED in seguito alle abbuffate è di rassegnazione e sconforto (Todisco et al., 2008); al contrario, nei soggetti bulimici prevale un atteggiamento attivo che cerca di eliminare gli effetti della perdita di controllo attraverso i comportamenti compensatori (Masheb et al., 2006).

Epidemiologia

Nella popolazione generale, i dati epidemiologici riguardanti il BED, hanno permesso di formulare delle considerazioni importanti sulla distribuzione di tale disturbo. Infatti essi dimostrano che il BED è il più diffuso tra i DCA con una variabilità che va dallo 0.6% al 3.5%: nello specifico, ha una prevalenza *lifetime* (intesa come percentuale di una popolazione che sviluppa una determinata malattia nel corso della sua vita) del 2.5 % negli adulti e dell'1.6% negli adolescenti (Hudson et al., 2007; Swanson et al., 2011). Come tutti i DCA, esso ha una prevalenza maggiore nel sesso femminile anche se, rispetto all'AN e alla BN, ha una distribuzione maschi/femmine meno asimmetrica: infatti, i maschi costituiscono il 30-40% dei casi di BED mentre il 5-15% per l'anoressia nervosa e la bulimia (Hudson et al., 2007). Il BED possiede un età d'esordio tardiva, con un picco massimo nella prima età adulta a differenza dell'AN e della BN dove l'età di esordio risulta essere più precoce, generalmente nell'adolescenza (Hudson et al., 2007). Analizzando i dati relativi ai tassi di remissione del BED, esistono delle evidenze contrastanti a tal riguardo: alcuni studi evidenziano alti tassi di remissione, portando a pensare ad un miglioramento più rapido dei sintomi rispetto agli altri DCA, mentre altri mostrano tassi di remissione simili a quelli della BN (circa il 27% a un anno dall'esordio e oltre il 70% dopo 10 o più anni). Per quanto riguarda l'instabilità diagnostica dei DCA, non è stato evidenziato il passaggio dei soggetti affetti da BED verso altri DCA.

Complicanze organiche

Nei soggetti affetti da BED, è frequente che si manifestino complicanze di ordine medico relazionate alla comorbidità che esiste tra tale disturbo e l'obesità e, quindi, al conseguente aumento di peso corporeo. Le patologie più frequenti sono:

1. *malattie cardiovascolari* delle arterie coronariche come infarto del miocardio ed angina pectoris (Manson et al.,1990), l'ipertensione arteriosa (Stamler et al., 1989), placche

- sclerotiche a livello arterioso, l'ictus ischemico (Rexrode et al., 1997; Walker et al., 1996), lo scompenso cardiaco (Shimizu e Isogai, 1993) e varicosità agli arti inferiori;
2. *malattie polmonari* come l'insufficienza respiratoria e la sindrome da apnea notturna (Grunstein et al., 1995);
 3. *malattie gastroenteriche* come lo sfiancamento delle pareti gastriche, calcolosi della colecisti, la steatosi epatica non alcolica che è più comune nei soggetti con obesità e diabete mellito di tipo 2 (Sheth et al., 1997);
 4. *diabete mellito di tipo 2*;
 5. *sindrome metabolica, resistenza insulinica e grasso intra-addominale*
 6. *cancro*: diversi studi hanno evidenziato un'elevata incidenza di alcuni tipi di cancro in pazienti obesi, come quelli ormono-dipendenti (endometriale, ovarico, mammella, cervicale, prostata) o gastrointestinali-epatici-renali;

Comorbidità psichiatrica

E' stato ampiamente dimostrato che in soggetti affetti da BED esiste una comorbidità con diverse patologie psichiatriche come quelle depressive, ansiose e maniaco-ossessive (Grilo et al., 2009). La condizione di comorbidità è direttamente correlata con il BED e non con la variazione di peso corporeo: infatti tanto maggiore è il grado di severità di tale disturbo tanto aumenta la prevalenza di disturbi psichiatrici in queste persone, ma non in relazione al grado di obesità dei pazienti. Tra i vari studi clinici che hanno messo in evidenza questa presenza concomitante di patologie psichiatriche con il BED è importante citare quello di Yanovski e collaboratori (1994). Essi analizzarono 128 pazienti obesi, non in trattamento: sottoponendo tali soggetti a questionari specifici si mise in evidenza come il 34% di questi mostrassero i sintomi del BED. Il risultato più eclatante di tale studio fu, però, che in tali soggetti vi fosse una presenza significativamente superiore di depressione maggiore, attacchi di panico, disturbo post-traumatico da stress rispetto ai soggetti non affetti da

BED, portando alla conclusione che tale disturbo fosse associato ad una maggiore incidenza di disturbi psichiatrici.

Inoltre, sembra essere stata messa in luce una marcata associazione fra lo sviluppo dei disturbi alimentari e l'uso di sostanze stupefacenti come marijuana, steroidi ed inalanti e, in forma minore, sigarette, alcool, cocaina, eroina, metamfetamine, ecstasy ed allucinogeni (Pisetsky et al., 2008).

Fattori di rischio ed eziopatogenesi

Il BED, come tutti i disturbi alimentari, è considerato una malattia multifattoriale, caratterizzata dalla complessa interazione di più fattori come quelli genetici, biologici, ambientali e psicologici, che possono favorire l'insorgenza ed il perpetuarsi della malattia.

Fattori genetici

Studi sulla familiarità e studi sui gemelli indicano che nei disturbi alimentari esiste una ereditarietà che varia dal 50% and 83% (Bulik and Tozzi, 2004; Javaras et al., 2008).

In particolare per il BED, Fowler e Bulik (1997) confrontando 20 donne obese con BED e 20 donne obese senza BED, hanno riportato che il 60% dei soggetti con BED riferisce di avere un familiare di primo grado affetto dallo stesso disturbo. Alla stessa conclusione arrivarono anche Hudson e collaboratori (2007) che intervistarono individui sovrappeso od obesi con e senza BED.

Il fatto che i fattori genetici rivestono un ruolo importante nell'eziologia del BED viene confermato anche da studi sui gemelli che hanno evidenziato un'ereditarietà del 41-45%. Javaras e collaboratori (2008) hanno stimato l'ereditarietà del BED sia in maschi che femmine in due campioni distinti: il primo campione, reclutato negli Stati Uniti, comprendeva 150 pazienti sovrappeso o obesi con BED, 150 pazienti sovrappeso o obesi senza BED e 888 parenti di primo grado; il secondo comprendeva 7.831 gemelli reclutati in Norvegia. Nel primo campione, l'ereditarietà stimata era intorno al 45% nei pazienti con il BED; nel secondo era intorno al 39%. Mitchell e collaboratori

(2010) sono arrivati allo stesso risultato (45% di ereditarietà) su un campione di gemelli dello stesso sesso. Per quanto riguarda gli studi d'associazione di geni si sono focalizzati principalmente sui sistemi neurotrasmettitoriali serotonina e dopamina. Monteleone e collaboratori (2006) hanno condotto uno studio d'associazione investigando il ruolo del polimorfismo del gene codificante per il trasportatore della serotonina in donne obese e non con il BED ed in donne normopeso. Gli autori hanno rilevato una frequenza più alta dell'allele L nelle pazienti affette da BED. Diversi studi, invece, hanno esaminato i polimorfismi genetici del sistema dopaminergico, focalizzandosi principalmente sul gene che codifica per il recettore D₂ (DRD2). Gli studi effettuati non hanno dimostrato risultati consistenti ad eccezione di quello condotto da Davis e collaboratori (2012) che evidenzia un'associazione positiva tra il polimorfismo Taq1 del gene DRD₂ ed il BED. Inoltre, un'associazione positiva è stata riscontrata con il polimorfismo del gene che codifica per il trasportatore della dopamina (Davis et al., 2007). Considerando altre molecole coinvolte nel controllo alimentare oltre ai sopraccitati neurotrasmettitori, nessuna associazione positiva è stata trovata con il polimorfismo Val66Met del gene del BDNF (Monteleone et al., 2006), mentre un'associazione positiva è stata riscontrata con il polimorfismo Leu73Met del gene della ghrelina (Monteleone et al., 2007), con il polimorfismo A118G del gene del recettore μ oppioide (ORMP1) (Davis et al., 2009) oltre che con quello 311T7C del gene del circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK), coinvolto nella regolazione dei ritmi circadiani (Monteleone et al., 2006).

Fattori biologici

Diversi studi clinici hanno dimostrato che in pazienti affetti da DCA si evidenziano alterazioni a carico di peptidi (sia centrali che periferici) e neurotrasmettitori implicati nella regolazione del comportamento alimentare. Queste alterazioni, anche se non è certo se siano la conseguenza o la causa dell'alterato comportamento alimentare, possono contribuire al mantenimento della malattia oltre che della ricaduta alla malattia stessa (Monteleone, 2011; Avena e Bocarsly, 2012). Ad

esempio, per ciò che concerne il BED, nei pazienti affetti da questo disturbo, la concentrazione di leptina circolante risulta essere significativamente superiore rispetto ai controlli sani. È da sottolineare il fatto che nei pazienti obesi con BED è stata evidenziata una fluttuazione delle concentrazioni ematiche (livelli normali o livelli estremamente aumentati) di questo ormone a seconda degli sbilanciamenti energetici che si verificano in seguito agli episodi di binge eating (Monteleone et al., 2000). Inoltre, in donne obese con o senza BED, la concentrazione plasmatica del recettore solubile della leptina (Ob-R) risulta essere ridotta se comparata con donne sane. Tale riduzione potrebbe essere una conseguenza dell'aumento della concentrazione di leptina stessa (Monteleone et al., 2002). Un altro ormone che risulta essere alterato in soggetti affetti da BED è la ghrelina. Infatti, le sue concentrazioni plasmatiche in pazienti affetti da BED, sia obesi che normopeso, risultano essere significativamente inferiori, a digiuno, rispetto ai controlli sani (Monteleone et al., 2005). A differenza della leptina, non vi è nessuna correlazione tra i valori delle concentrazioni plasmatiche di ghrelina e la frequenza delle abbuffate. Le ridotte concentrazioni plasmatiche di questo ormone potrebbero essere imputabili all'incremento dei depositi di grasso e all'aumento dei livelli di leptina che modula negativamente la sua produzione (Weigle et al., 2002). La neurobiologia che sta alla base del comportamento di binge eating sembra sovrapporsi a quella che sta alla base dell'abuso di sostanze. Come già detto precedentemente, cibi altamente palatabili esercitano i loro effetti di rinforzo positivo attraverso l'attivazione della via mesocorticolombica. Alterazioni a carico di questa via, specificatamente per la dopamina ed il sistema oppioide endogeno sembrano essere implicate nella transizione dal "overeating" al comportamento di binge eating (consumo compulsivo di cibo altamente palatabile, in un breve periodo di tempo). Di fatto, diverse sono le evidenze, non solo nell'uomo ma anche negli animali da laboratorio, di un coinvolgimento della dopamina e degli oppioidi nel BED (Berner et al., 2011). Utilizzando modelli che riproducono nell'animale il comportamento di binge verso un cibo altamente palatabile, è stato dimostrato che durante gli episodi di binge c'è un rilascio di dopamina nella shell del nucleo

accumbens, in modo del tutto paragonabile ai farmaci d'abuso (Rada et al., 2005). Inoltre, sempre nell'animale da laboratorio, è stato dimostrato un aumento del binding dei recettori D₁ nella shell del nucleus accumbens e una diminuzione del binding del recettore D₂ nello striato (Coulantoni et al., 2001). Gli oppioidi endogeni giocano un ruolo importante nelle proprietà edoniche del cibo e sono particolarmente implicate nel consumo di cibo altamente palatabile. Studi nell'animale da laboratorio hanno dimostrato che il consumo compulsivo di una soluzione di sucrosio determina, una riduzione dell'espressione del peptide oppioide encefalina oltre che una riduzione dell'espressione del recettore oppioide di tipo μ a livello del nucleo accumbens. In riferimento alla modulazione della gratificazione connessa con l'assunzione del cibo, negli ultimi anni si sta facendo sempre più strada l'ipotesi che una disfunzione dei sistemi implicati nella regolazione dei processi di gratificazione sembrerebbe uno dei meccanismi chiave responsabili dello sviluppo dei DCA (Dichter et al., 2012; Davis and Carter, 2009). A sostegno di tale ipotesi, studi di neuroimaging nell'uomo hanno dimostrato che alterazioni sia strutturali che funzionali delle aree cerebrali coinvolte nei processi di reward possono predisporre all'insorgenza ed al mantenimento dei DCA (Frank, 2013). Specificatamente per il BED, è stato dimostrato che in risposta a immagini relative ad un cibo altamente calorico, gli individui con BED possedevano una maggiore attivazione della corteccia orbito-frontale rispetto ai controlli sani (Schienle et al., 2009). Tale area sembra essere implicata nella dipendenza da sostanze d'abuso, in particolare nel desiderio impellente ed irrefrenabile verso l'assunzione di tale sostanza definito "craving". Questo suggerisce che questa regione cerebrale sia implicata nel craving non solo dei farmaci d'abuso ma anche verso quello di un cibo altamente palatabile (Volkow and Wise, 2005). Inoltre, studi di imaging hanno dimostrato che il desiderio per un cibo altamente palatabile è associato ad un rilascio di dopamina nello striato (Volkow et al., 2002). In riferimento a questo Wang e collaboratori (2011) hanno dimostrato che in pazienti obesi con BED, in risposta ad una stimolazione indotta dal cibo, si ha un maggiore rilascio di dopamina nello striato rispetto a pazienti obesi senza BED.

Fattori ambientali e psicologici

I fattori ambientali e quelli psicologici sono profondamente relazionati tra loro e con l'ideale di bellezza che ha preso piede nell'ultimo trentennio: la società enfatizza la magrezza che viene considerata come ritratto di salute e benessere sia mentale che fisico (Wieseman et al., 1992). Il continuo desiderio di raggiungere un'immagine corporea consona a quella dettata dai canoni della società, porta l'individuo ad un sentimento di frustrazione causando, in un gran numero di casi, l'insorgenza dei disturbi alimentari. E' stato dimostrato che, alcuni fra i soggetti che mettono in atto continue diete altamente restrittive, hanno una maggiore predisposizione all'insorgenza del BED: infatti circa il 50% dei pazienti affetti da tale disturbo evidenziano nella loro anamnesi continue diete, dai risultati disastrosi, prima dell'insorgenza delle abbuffate (Howard et al., 1999).

Terapia

Il BED richiede, dal punto di vista terapeutico, un approccio multidisciplinare, che riesca ad analizzare ed affrontare le diverse problematiche che costituiscono le basi di tale disturbo. Sono stati compiuti notevoli progressi in merito, ma è ovvio che le problematiche da affrontare sono ancora numerose e, affinché la terapia possa essere definita efficace, ci sono diversi punti da approfondire come:

- la psicopatologia specifica del disturbo dell'alimentazione (ad es. l'immagine corporea, la disinibizione);
- la psicopatologia associata (ad es. l'ansia e la depressione);
- l'aumento del peso corporeo.

Nel disturbo da alimentazione incontrollata risulta particolarmente efficace ricorrere ad una terapia che contempli un intervento congiunto di tipo dietologico, psicologico e farmacologico. L'intervento dietologico, finalizzato alla riduzione del peso corporeo, si articola su programmi

comportamentali basati su una riqualificazione ed un controllo alimentare, utilizzando alimenti a basso o bassissimo contenuto calorico. Per ciò che riguarda l'intervento psicologico, esistono differenti approcci messi in atto dal terapeuta per risolvere le problematiche inerenti al BED. Tra quelli più utilizzati ricordiamo: la terapia cognitivo-comportamentale (CBT), la terapia interpersonale (IPT) e la terapia comportamentale dialettica (DBT). La CBT interviene sulla concezione sbagliata che il paziente ha di sé stesso e del mondo che lo circonda. Il soggetto affetto da BED sviluppa comportamenti sbagliati, riconducibili alla sua errata condotta alimentare, che, con il tempo, si consolida come abitudine. L'individuazione di tali comportamenti, induce il trattamento psicologico a isolare quelle emozioni negative che innescano gli episodi di binge eating (Fairburn et al., 1993). Inizialmente l'approccio psicologico prevede una rieducazione del paziente verso un'alimentazione sana ed equilibrata, che comprenda, ogni tanto, qualche pasto basato su cibi calorici, limitandone però gli eccessi. Alcuni studi clinici hanno dimostrato che la CBT è efficace nel ridurre le abbuffate (Wilfley et al., 1997) con una percentuale di successo, compresa nel range di intervento tra 50% e 90%. La IPT è una terapia basata sullo svisceramento dei problemi interpersonali, durante un periodo di circa 4-5 mesi, in quei soggetti affetti da BED dove gli stati d'animo negativi sono il fattore di innesco delle abbuffate e della condotta alimentare errata. Studi clinici hanno dimostrato che i miglioramenti ottenuti tramite l'applicazione della IPT si mantengono tali anche a distanza di un anno dalla terapia (Hay, et al., 2004; Vaidya, 2006) anche se non vennero dimostrati dei risultati statisticamente significativi sulla riduzione del peso corporeo (Wilfley et al., 2002). La DBT si basa sulla cosiddetta "regolazione emotiva" con la quale si crea un collegamento delle emozioni negative con il disturbo alimentare (Arnouk et al., 1992; Polivy, Herman, 1993): infatti, si ritiene che gli episodi di binge siano derivati dall'incapacità del soggetto ad affrontare proprio questi stati d'animo dolorosi (Linehan, Chen, 2005; Waller, 2003; Wisniewsky e Kelly, 2003). Quindi, lo scopo della DBT è di insegnare al paziente a controllare e gestire tali emozioni negative, occupandosi del problema dell'alimentazione incontrollata solo in forma indiretta (Marcus

et al., 2004; Todisco e Vinai, 2009). Essendo il BED una patologia con una neurobiologia non del tutto chiarita, non è stato possibile individuare un farmaco od una classe di farmaci d'elezione anche se gli antidepressivi, gli anoressizzanti ad azione centrali e gli anticonvulsivanti si sono dimostrati efficaci nella terapia di tale disturbo.

Antidepressivi. Diversi antidepressivi triciclici sono stati testati con ad es. l'imipramina (Alger et al., 1991) e la desipramina (McCann et al., 1990) che si è visto riducono, a breve termine, la frequenza delle abbuffate. Per ciò che concerne gli inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRI) trial clinici randomizzati-placebo controllati hanno evidenziato l'efficacia di fluvoxamina (Pearlstein et al., 2003; Hudson et al., 1998), sertralina (McErloy et al., 2000), fluoxetina (Arnold et al., 2002) e citalopram (McErloy et al., 2000). La venlafaxina, un inibitore sia del reuptake della serotonina che della noradrenalina (SNRI), utilizzata assieme alla terapia nutrizionale e comportamentale, si è dimostrata ridurre sia le abbuffate che il peso (Malhotra et al., 2002) ma questi dati non sono stati confermati da altri studi. In un trial clinico randomizzato in doppio cieco l'atomoxetina, un inibitore altamente selettivo del reuptake della noradrenalina (McErloy et al., 2007), è risultata superiore al placebo nel ridurre le abbuffate, il peso e i sintomi psichiatrici. Una metanalisi degli studi sugli antidepressivi nel BED (Stefano et al., 2008) dimostra che questi farmaci ottengono tassi di remissione dalle abbuffate più alti di quelli del placebo, ma inducono una perdita di peso modesta, inoltre vengono somministrati alla dose massima consigliata e una volta sospeso il farmaco i pazienti tendono a ritornare alla condizione iniziale. Gli SSRI al contrario possono indurre soprattutto a lungo termine un aumento del peso corporeo (Hirschfeld et al., 2003).

Anoressizzanti ad azione centrale. In questa classe rientrano quei farmaci che modificano la neurotrasmissione nelle regioni cerebrali deputate al controllo dell'appetito e della sazietà (Hansen et al., 1999). Ad es. l'efficacia della sibutramina, un inibitore del reuptake della serotonina e della noradrenalina strutturalmente molto simile alla venlafaxina, è stata dimostrata in diversi trial clinici (Yanovski et al., 2002).

Anticonvulsivanti. Due nuovi farmaci, il topiramato e la zonisamide, per il loro effetto di riduzione dell'appetito e del peso sembrano di un certo interesse nel BED, sebbene non ne sia chiaro il meccanismo d'azione. Le prime impressioni sull'efficacia del topiramato nel sopprimere le abbuffate in soggetti con una comorbidità per i disturbi dell'umore sono state confermate da alcuni studi clinici e con mantenimento dei risultati nel tempo (McElroy et al., 2007). L'utilizzo di entrambi i farmaci è limitato da notevoli effetti collaterali e dal fatto di non essere riconosciuti ufficialmente per il trattamento del BED.

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

I composti cannabinoidi sono molto più che semplici costituenti psicoattivi di una droga d'abuso: il termine "cannabinoidi" comprende tutti quei componenti che sono attivi sul sistema endogeno di segnalazione (sistema endocannabinoide) ed include, non solo i composti derivanti dalla pianta *Cannabis sativa* (fitocannabinoidi), ma anche tutti quelli che formano parte del sistema di neuromodulazione (endocannabinoidi) (Ramos et al., 2005). Ad oggi, le conoscenze riguardanti tale sistema sono notevolmente migliorate grazie allo sviluppo di farmaci (ligandi sintetici ed altri composti capaci di agire a diversi livelli del metabolismo e del meccanismo d'azione) che hanno permesso, negli ultimi anni, di considerare le potenziali azioni terapeutiche di tali composti.

Cenni storici

Il termine "cannabinoidi" deve la sua origine alla *Cannabis Sativa* (Fig. 2), pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Cannabinacee. Essa venne utilizzata sin dall'antichità nell'ambito tessile ed edile, ma anche in quello medico e ricreativo come pianta medicinale e stupefacente grazie alle sue presunte proprietà medicinali e psicotrope. Infatti, tali proprietà medicinali, vennero sfruttate in differenti epoche storiche: le testimonianze più antiche le ritroviamo durante il regno dell'imperatore cinese Shen Nung nel 2700 a.C nel quale, la cannabis, venne utilizzata per il trattamento dei disordini femminili, gotta, reumatismo, debolezza mentale. In India venne utilizzata sia per le cerimonie religiose che in caso di febbre, dissenteria e malattie veneree; nell'antica Roma venne sfruttata come anticonvulsivante ed oressizzante a causa delle sue proprietà centrali (Mechoulam, 1986). Tutt'oggi l'utilizzo dei cannabinoidi in ambito medico trova la sua applicazione nella chemioterapia come potente antiemetico, nel trattamento dei pazienti affetti da AIDS come stimolatore dell'appetito, e viene utilizzato per le sue proprietà analgesiche (Grotenhermen, 2005). Proprio per tali motivazioni, l'interesse nei confronti delle potenzialità terapeutiche di questa pianta è particolarmente cresciuto negli ultimi decenni portando la comunità

scientifico ad avanzare l'ipotesi, notevolmente fondata, di un possibile uso terapeutico di tale pianta. Attualmente, la cannabis è una fra le droghe illegali più largamente consumate nel mondo occidentale.



Fig.2 : pianta della *Cannabis Sativa*

Composizione chimica

Dalla *Cannabis Sativa*, sono stati identificati ed isolati un elevato numero di composti chimici (circa 500): solo 66 tipi di questi possono essere considerati cannabinoidi naturali o fitocannabinoidi (derivanti dal metabolismo secondario della pianta che si presentano solamente in alcune varietà della pianta stessa) (Dewey, 1986). Essi appartengono alla classe biochimica dei terpenofenoli e sono i responsabili dell'azione psicoattiva dei differenti preparati della pianta. Tra questi annoveriamo i composti più ampiamente conosciuti quali il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC) ed il cannabidiolo (CBD). La scoperta e l'isolamento del principale componente psicoattivo della Cannabis, il THC, da parte di Gaoni e Mechoulam nel 1964, diede il via ad un'innumerabile quantità di studi che permisero di chiarire quale fosse il meccanismo d'azione di questo composto e la sua conseguente attività farmacologica.

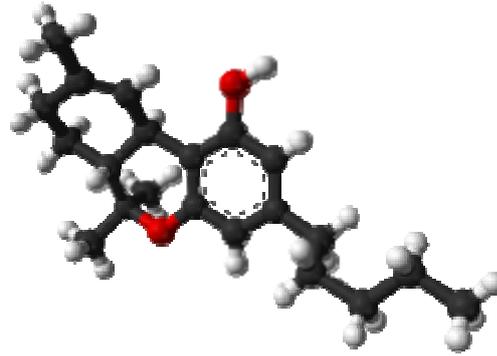
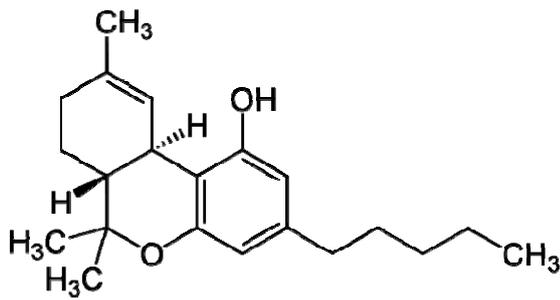


Fig.3: Formula di struttura del THC e rappresentazione tridimensionale della molecola (fonte:Internet)

Negli ultimi decenni l'interesse per lo studio dei cannabinoidi è cresciuto in forma esponenziale in seguito all'ipotesi che potesse esistere un sistema cannabinoide endogeno che, modulato, fosse in grado di svolgere un ruolo importante nella farmacoterapia di diverse patologie. Al principio si riteneva che i cannabinoidi naturali, essendo altamente lipofili, interagissero con i lipidi di membrana modificandone la fluidità: durante la prima metà degli anni 80, diversi gruppi sperimentali dimostrarono che il THC inibiva l'attività dell'adenilato ciclasi (AC) nelle membrane cellulari di neuroblastoma (Howlett et al., 1984) e, studi di binding recettoriale, evidenziarono la capacità del CP 55940 di legare specifici siti (Devane et al., 1988). Fu così che vennero scoperti i recettori per i cannabinoidi: i CB₁, la cui struttura fu identificata sia nel ratto (Matsuda et al., 1990) che nell'essere umano (Gerard et al., 1991), ed i recettori CB₂, clonati nel 1993 (Munro et al., 1993), che si differenziano tra loro sia per la distribuzione anatomica che per il meccanismo di trasduzione del segnale. Il sistema cannabinoide endogeno o endocannabinoide (eCS) è un complesso sistema regolatore fondamentale per il corretto funzionamento dell'organismo capace di modulare un'innumerabile varietà di effetti fisiologici. Gli endocannabinoidi, i recettori per i cannabinoidi (CB₁ e CB₂), i geni che codificano per questi e la cascata enzimatica che permette la sintesi e la degradazione degli stessi danno vita a questo sistema (Piomelli, 2003).

I recettori CB₁ e CB₂

I cannabinoidi esercitano la loro azione farmacologica attraverso l'attivazione di recettori specifici di membrana. Fino ad ora sono stati identificati due tipi di recettori per i cannabinoidi: i CB₁ ed i CB₂; è stata descritta, inoltre, una variante del recettore CB₁, denominata CB_{1A}, che deriva da uno "splicing" alternativo e che possiede una distribuzione anatomica simile (Shire et al., 1996). Sia i recettori CB₁ che i CB₂ appartengono alla grande famiglia di recettori metabotropici appartenenti alla classe di recettori accoppiati a proteina G (GPCRs): essi sono caratterizzati da un'unica catena polipeptidica a sette passi trans-membrana il cui terminale amminico (su cui ritroviamo i vari siti di glicosilazione) si affaccia sul versante extracellulare mentre quello carbossilico (su cui ritroviamo i siti di fosforilazione) sul versante intracellulare (Fig. 4). Tra loro mostrano un'omologia di struttura del 44% che cresce sino ad arrivare al 68% quando vengono considerati anche i domini transmembrana.

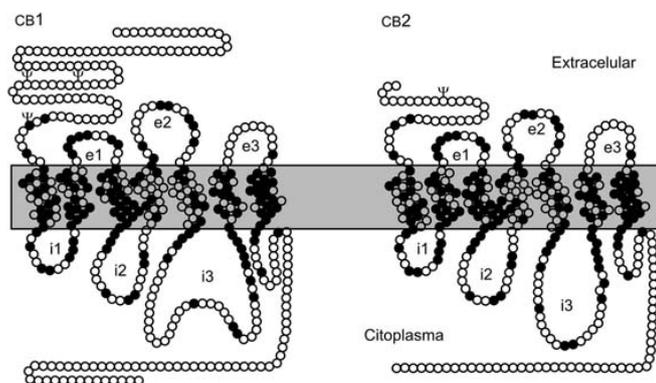


Fig. 4: rappresentazione dei recettori CB₁ e CB₂

E' ormai noto che sia il sottotipo CB₁ e che quello il CB₂ espletano le loro funzioni fisiologiche attraverso l'attivazione della proteina G α i/o ad essi associata: infatti, essendo una proteina inibitoria, la sua attivazione porta all'inibizione dell' AC (per dissociazione della subunità α dal dimero $\beta\gamma$) con la conseguente riduzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP) ed il blocco transitorio dell'attivazione della protein-chinasi A (PKA) (Felder et al., 1992). Inoltre viene attivata la via delle

MAP-chinasi (Pertwee et al., 2002) e vengono modulati alcuni canali ionici: i canali al potassio transitorio di tipo A coinvolti nella ripolarizzazione e di tipo inward rectifying (Mackie et al., 1995) vengono attivati mentre i canali al calcio di tipo N e P/Q vengono inibiti. In alcune circostanze particolari, i recettori CB₁ possono accoppiarsi a proteine Gs ed a Gq/11 (Childers, 2006). Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che i recettori CB₁ sono ampiamente distribuiti nel sistema nervoso sia a livello centrale che periferico. A livello centrale, attraverso studi di autoradiografia, di immunoistochimica e d'ibridizzazione in situ, è stato possibile evidenziare una distribuzione regionale dettagliata di tali recettori nel cervello di numerosi mammiferi ed altre specie come per esempio quello di ratto (Herkenham et al., 1990; Herkenham et al., 1991; Mailleux et al., 1992; Egertova et al., 1998; Pettit et al., 1998; Tsou et al., 1998; Egertova et al., 2000; Moldrich et al., 2000; Hajos et al., 2000), di topo (Marsicano et al., 1999; Hermann et al., 2002), uccello (Soderstrom et al., 2000), di alcuni primati (Ong et al., 1999), ed infine dell' uomo (Mailleux et al., 1992; Westlake et al., 1994; Glass et al., 1997). L'elevata espressione di tali recettori in specifiche aree cerebrali è del tutto in linea con gli effetti comportamentali che i cannabinoidi esercitano su numerose funzioni fisiologiche: infatti, la presenza di un'alta densità dei CB₁ a livello dell'ippocampo, è correlato con gli effetti negativi esercitati dai cannabinoidi sulla memoria e sulla cognizione (Herkenham et al., 1990, 1991) mentre a livello dei gangli della base (sostanza nigra, globo pallido, caudato), della corteccia e del cervelletto evidenzia il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione del controllo motorio. Inoltre numerose evidenze sperimentali dimostrano che tale sistema sia coinvolto anche nella regolazione del metabolismo energetico e della condotta alimentare: ne è la prova la presenza di tali recettori, anche se in densità ridotta, a livello ipotalamico, più precisamente nei nuclei all'interno dei quali sono localizzati i neuroni che producono neuropeptidi anoressizzanti ed oressizzanti capaci di controllare l'apporto alimentare (Pacher et al., 2006; Pagotto et al., 2006) e nelle aree limbiche come il nucleo accumbens, area tegmentale ventrale ed amigdala implicati nella modulazione della componente

edonica del cibo. La modesta e limitata letalità, direttamente correlabile all'overdose di cannabis, trova la sua biologica giustificazione nell'assenza di recettori CB₁ nel tronco cerebrale, area nella quale sono localizzate le funzioni respiratorie e cardiache (Millhorn e Eldridge, 1986). Nonostante la loro localizzazione sia prettamente a livello centrale, è stata identificata, inoltre, una bassa densità recettoriale anche in tessuti periferici includendo il sistema immunitario, l'intestino, la milza, il cuore, sistema riproduttivo, il midollo osseo e le tonsille (Fonseca et al., 2009).

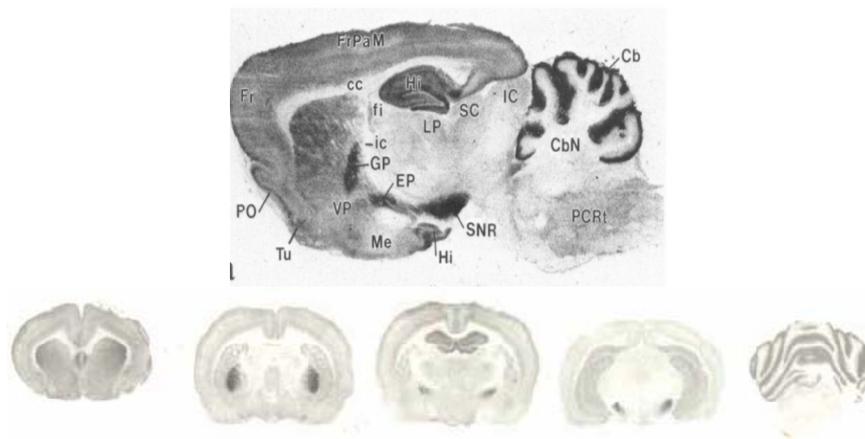


Fig. 5: distribuzione anatomica centrale dei recettori CB₁ in sezioni trasversali e sagittali di cervello di ratto. Cb, cervelletto; CbN, nuclei profondi del cervelletto; cc, corpo calloso; EP, nucleo entopeduncolare; fi, fornice; Fr, corteccia frontale; FrPaM, área motora del cotex parietal frontal; GP, globo pallido; Hi,ippocampo; ic, capsula interna; IC, collicolo inferiore; LP, nucleo posteriore laterale talamico; Me, nucleo mediale dell' amigdala; PCRt, nucleo reticolare parvocellulare; SC, collicolo superiore; SNR, sostanza nigra pars reticulata; VP, nucleo ventrale posteriore del talamo (Herkenham et al., 1991).

I recettori CB₂ mostrano un'omologia di sequenza con i recettori CB₁ del 44% (68% se vengono considerate le porzioni transmembranarie). Inizialmente il recettore CB₂, venne definito come “periferico” a causa della sua elevata espressione a livello delle cellule ematopoietiche e di differenti tipi di cellule del sistema immunitario, motivo per il quale gli effetti immuno-modulatori dei composti cannabinoidi vennero attribuiti, fondamentalmente, alla sua interazione con questo sottotipo di recettore (Mato et al., 2003). Infatti, i recettori CB₂ sono implicati nella regolazione di

numerose funzioni concernenti il sistema immunitario come la liberazione di citochine e la migrazione delle cellule immunitarie (Klein et al., 2003). Inoltre la loro espressione era notevolmente elevata anche in cellule non immunitarie come i cheratinociti, gli osteoclasti e il pancreas endocrino. È stato dimostrato che, in alcune condizioni patologiche acute ma soprattutto in quelle croniche come l'Alzheimer, la corea di Huntington, l'ischemia, la sclerosi multipla, i recettori CB₂ vengono iperespressi nelle aree coinvolte in tali patologie come per esempio ippocampo, cervelletto, corteccia prefrontale e sinapsi di aree corticali. Inizialmente, la presenza a livello centrale dei recettori CB₂ era stata riscontrata preferenzialmente in cellule gliali (nella microglia reattiva o astrociti) (Fernández-Ruiz et al., 2007). Recentemente, è stata dimostrata la presenza, in condizioni non patologiche, di tale recettore in strutture cerebrali specifiche: studi sperimentali hanno evidenziato l'espressione dell'RNA messaggero e della proteina per il recettore CB₂ nel sistema nervoso centrale (Brusco et al., 2008; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006), nel tronco encefalico (Van Sickle et al., 2005), nelle cellule progenitrici della zona subgranulare del giro dentato nell'ippocampo (Palazuelos et al., 2006), nel talamo (Jhaveri et al., 2008), nei neuroni piramidali dello strato III and V della corteccia cerebrale di alcuni primati (Lanciego et al., 2011), nella corteccia entorinale (Morgan et al., 2009), nel cervelletto ed ippocampo di ratto (Suarez et al., 2009).

Le implicazioni fisiologiche dei recettori CB₂ nel cervello non sono state sufficientemente investigate, anche se si è ipotizzato la loro possibile partecipazione nei disturbi depressivi e nell'assunzione delle sostanze d'abuso (Onaivi et al., 2006a, 2006b).

Inoltre, studi sperimentali realizzati su topi knock-out per i CB₁ (CB₁^{-/-}) e per i CB₂ (CB₂^{-/-}) hanno mostrato che alcuni degli effetti degli endocannabinoidi non erano mediati né dai CB₁ né dai CB₂ (Howlett, 2004) suggerendo che questi potessero essere espletati grazie ad alcune proprietà chimiche dei ligandi cannabinoidi e non tramite la loro azione su recettori specifici. Per esempio, le proprietà antiossidanti di alcuni ligandi cannabinoidi o quelle lipofile possono produrre

interazioni non specifiche a livello della membrana plasmatica o in differenti siti intracellulari (Begg et al., 2005). Esistono, inoltre, altre evidenze sperimentali che non possono essere spiegate attraverso questi meccanismi e che suggeriscono l'esistenza di altri recettori per i cannabinoidi.

Negli ultimi anni sono stati proposti, come nuovi recettori per i cannabinodi, due recettori definiti "orfani" (mancano di ligando) accoppiati alla proteina G: il primo denominato GPR55 o CB3 (Lauckner et al., 2008; Ryberg et al., 2007) espresso a livello centrale ed implicato in processi di metabolismo lipidico e nella funzione vascolare (Baker et al., 2006); il secondo chiamato GPR119, accoppiato a proteina Gs, è stato proposto come recettore per l'oleoiletanolamina (OEA) (Brown, 2007). Il ruolo fisiologico di quest'ultimo non è stato determinato del tutto e non è stato nemmeno chiarito il suo legame con il sistema endocannabinoide nonostante si pensi possa essere implicato nel metabolismo lipidico per la sua elevata espressione nel pancreas e nel tratto gastrointestinale.

I cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi

In seguito all'identificazione e clonazione dei recettori per i cannabinoidi, fu portata avanti l'ipotesi che esistessero delle molecole endogene in grado di legarsi selettivamente a tali recettori. Essi sono stati rinvenuti in tutti i *phila* studiati ed in tutti, è stata riscontrata nella struttura chimica l'acido arachidonico (Valenti et al., 2005). Nel 1992 Devane e collaboratori identificarono ed isolarono nel cervello di maiale, il primo ligando endogeno, l'N-arachidonoiletanolamina (AEA) che denominarono anandamide (dal sanscrito ananda che significa "*stato di grazia o beatitudine*" ed "*amide*" che deve il suo nome dalla sua struttura chimica). L'AEA era in grado di interagire con i recettori per i cannabinoidi con elevata affinità e di mimare quelli che erano gli effetti comportamentali del THC quando somministrato nell'animale (Devane et al., 1992). Solo tre anni più tardi un secondo ligando endogeno, denominato 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) venne isolato dall'intestino di cane (Mechoulam et al., 1995) e dal cervello di ratto (Sugiura et al., 1995). Tali composti vennero chiamati endocannabinoidi cioè ligandi endogeni che vengono prodotti in

differenti organi e tessuti derivanti strutturalmente dall'acido arachidonico. Tali regolatori lipidici erano in grado di legare selettivamente i recettori per i cannabinoidi e possedevano un'attività cannabimimetica cioè erano in grado di mimare la maggior parte degli effetti descritti per i derivati della cannabis. Successivamente, in tempi più recenti, sono stati identificati altri composti che sono in grado di legare i recettori per i cannabinoidi e per questo suggeriti come nuovi composti endocannabinodi: 2-arachidonoilgliceriletere (2-AGE, noladin-etero), un etere che mostra caratteristiche di agonista sia dei recettori CB₁ ($K_i=21.2 \pm 0.5$ nM) che dei recettori CB₂ ($K_i > 3 \mu\text{M}$) anche se l'affinità con cui lega tali recettori è differente (Hanus et al., 2001); l'O-arachidonoiletanolamina (virodamina), molecola che possiede caratteristiche di parziale agonista/antagonista sul CB₁ e agonista sul CB₂ (Porter et al., 2002); la n-arachidonoildopamina (NADA, Huang et al., 2002; De Petrocellis et al., 2004), capace di legare i recettori CB₁ con una selettività maggiore rispetto ai CB₂. Oltre ai ligandi endogeni sopraccitati, nell'ultima decade hanno assunto una rilevanza elevata un insieme di molecole che strutturalmente sono strettamente correlate con l'AEA e che appartengono alla famiglia delle N-aciletanolamine (NAEs). In particolare, sono state isolate e caratterizzate la N-oleiletanolamina (OEA), la N-palmitoiletanolamina (PEA), la N-linoleiletanolamina (LEA) e la N-estearoiletanolamina (SEA). Questi composti possiedono un'attività farmacologica in vivo di tipo endocannabinoide anche se gli effetti individuati non possono essere ascrivibili all'attivazione di nessuno dei recettori per i cannabinoidi conosciuti fino ad oggi, poiché queste molecole non si legano ad essi ma esplicano le loro funzioni attraverso l'attivazione dei recettori dei proliferatori dei perossisomi (PPARs) (Grygiel-Górniak, 2014). E' stato dimostrato che queste molecole sono implicate nel controllo del dolore, nell'infiammazione, nel metabolismo lipidico e nell'assunzione di cibo (Pistis e Melis, 2010).

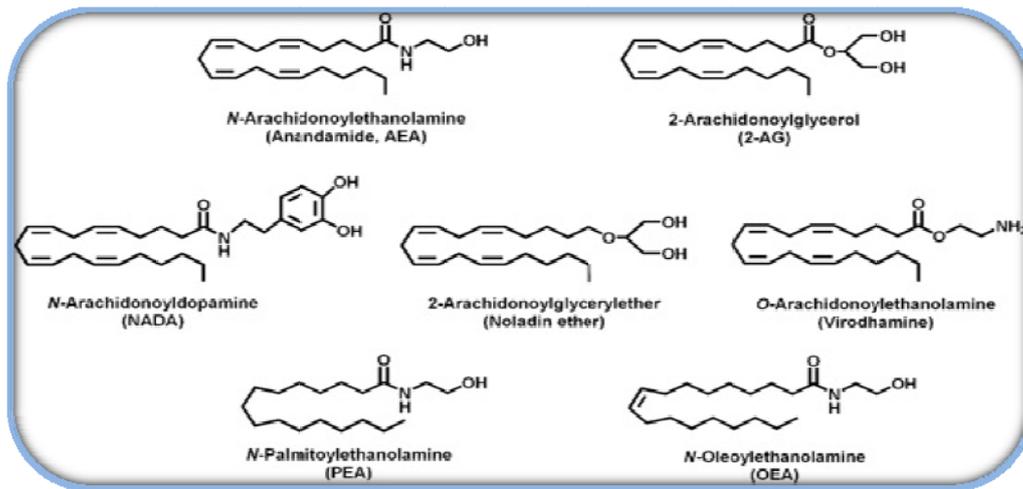


Fig. 6: formule di struttura degli endocannabinoidi classici e di quelli di recente identificazione (Fonte: Internet)

Metabolismo dei cannabinoidi

È ormai noto da tempo che gli endocannabinoidi sono molecole sinaptiche peculiari anche se, al pari di altri neurotrasmettitori presenti a livello centrale, sono sottoposti a meccanismi di sintesi, rilascio, ricaptazione e degradazione. Però a differenza di quello che accade con i neurotrasmettitori classici e data la natura lipidica di questi ligandi endogeni, non sono immagazzinati in vescicole e rilasciati tramite esocitosi, ma sono prodotti “*on demand*” (su richiesta) a partire da precursori lipidici localizzati nella membrana plasmatica in risposta a particolari stimoli fisiologici e patologici (Piomelli, 2003). Inoltre gli endocannabinoidi agiscono come messaggeri retrogradi: essi vengono sintetizzati nel terminale postsinaptico, rilasciati nello spazio sinaptico per poi attivare i recettori CB₁ a livello presinaptico (Wilson e Nicoll., 2002), riducendo il rilascio di altri neurotrasmettitori come l’acido γ -amminobutirrico (GABA) ed il glutammato.

Si ritiene che questa segnalazione retrograda cannabinoidea sia ampiamente distribuita in tutto il SNC, anche se sembra che sia più concentrata in alcuni tipi di neuroni (neuroni gabaergici, glutamatergici e colinergici) ed in specifiche regioni cerebrali come ad esempio l’area ventrale del tegmento (VTA) ed ipotalamo. Gli endocannabinoidi possono anche agire in forma paracrina od autocrina: questo tipo di trasmissione è applicabile per le cellule degli organi periferici come gli

adipociti, le cellule endopancreatiche e gli epatociti. I cannabinoidi endogeni vengono sintetizzati e liberati in risposta ad un aumento della concentrazione intracellulare di calcio, prodotta in seguito ad una depolarizzazione o in seguito ad attivazione di recettori metabotropici accoppiati a proteine $G_q/11$, il cui meccanismo suggerisce che tali composti si producono in momenti di intensa attività del sistema nervoso centrale (Mackie et al., 2006). L'AEA ed il 2-AG, essendo stati i primi ad essere identificati sono quelli che, ad oggi, sono stati meglio caratterizzati.

Anandamide (AEA)

L'anandamide viene considerata come un modulatore di numerose funzioni fisiologiche sia del sistema nervoso centrale che del sistema immunitario, endocrino, riproduttivo e del tratto gastrointestinale (Battista et al., 2012). Sono ormai ben stabilite le capacità dell'AEA, nel produrre analgesia ed ipotermia, nel ridurre l'emesi, nel controllare l'attività motoria, nel stimolare l'appetito, ed infine nel presentare effetti antiproliferativi.

L'AEA esercita i suoi effetti biologici attraverso l'interazione con i recettori per cannabinoidi: essa, presenta un'attività di tipo agonista parziale (comportamento insolito per un ligando endogeno) sia per il CB_1 che per il CB_2 . Evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'AEA è in grado di interagire con altri target molecolari fra i quali i recettori della proliferazione perossisomale (PPARs) (O'Sullivan et al., 2007) ed i recettori vanilloidi 1 (TRPV1) (Rosenbaum e Simon, 2007) ipotizzando che, alcuni degli effetti mediati dall'AEA possano avvenire tramite meccanismi non mediati dai recettori CB. L'AEA viene sintetizzata attraverso due vie biosintetiche indipendenti: la prima consiste nella condensazione diretta dell'acido arachidonico (AA) con l'etanolina: questi due substrati sono ottenuti mediante la rottura di precursori fosfolipidici di membrana per opera della fosfolipasi A_2 e D rispettivamente (Vinod e Hungund, 2005). La condensazione avviene tramite una reazione catalizzata dall'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH), implicata anche nel processo di degradazione della stessa (Ueda et al., 1995). Si ritiene, però, che questa via

non abbia rilevanza fisiologica in quanto, affinché si produca questa reazione, si necessitano concentrazioni eccessivamente elevate dei substrati (Okamoto et al., 2007). La seconda, invece, porta alla sintesi di AEA a partire dalla fosfatidiletanolamina (PE), presente nella membrana plasmatica, tramite la sua idrolisi da parte di fosfodiesterasi. Questa via di sintesi si sviluppa in due fasi ben precise: la prima consiste nell'attivazione dell'enzima N-acil-transferasi (NAT) attivata dal calcio e dall' AMPc che catalizza il trasferimento di una molecola di acido arachidonico dalla posizione 1 della fosfatidilcolina ad una molecola di fosfatidiletanolamina formando N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NarPE). Questa molecola è poi idrolizzata dalla fosfolipasi D (NAPE-PLD) liberando così AEA e acido fosfatidico (Piomelli, 2003). Evidenze sperimentali recenti mostrano la possibile esistenza di altri due meccanismi di sintesi dell'AEA: uno che riguarda l'idrolisi della NarPE tramite una fosfolipasi C (PLC) che porta alla formazione della fosfoanandamide che successivamente verrà defosforilata tramite la inositolo 5'fosfatasi SHIP1 e la tirosina fosfatasi PTPN22 e convertita in AEA (Liu et al., 2008). Nell'altro meccanismo si arriverebbe alla sintesi di AEA tramite una doppia deacilazione della N ArPE tramite un'idrolasi (Abh4) che porta alla formazione del glicerofosfoN-ArPE che tramite una fosfodiesterasi produrrà AEA e glicerol-P (Liu et al., 2008).

2-arachidonoilglicerolo (2-AG)

Il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) presenta molte similitudini con l'AEA: entrambi i composti sono prodotti principalmente "*on demand*", ma la differenza che li contraddistingue è che il 2-AG si comporta come agonista puro dei recettori per i cannabinoidi. Il 2-AG venne considerato inizialmente un endocannabinoide prettamente periferico poiché identificato proprio in tessuti periferici: successivamente è stata riscontrata la sua presenza nel cervello in concentrazioni marcatamente superiori rispetto a quelle dell' AEA (nell'ordine delle nmol/g di tessuto) in particolar modo in aree come l' ippocampo, lo striato, diencefalo e cervelletto. La via biosintetica

del 2-AG può partire dal fosfoinositolobifosfato (PIP₂) che viene idrolizzato grazie all'azione di una fosfolipasi C generando una molecola di diacilglicerolo (DAG), un intermedio lipidico che si può formare anche partendo dall'acido fosfatidico dal quale viene rimosso un gruppo fosfato grazie all'azione di una fosfoidrolasi. Il DAG grazie all'azione della diacilglicerolipasi (DAGL) viene convertito in 2-AG. Recentemente si è ipotizzato possa esistere un'altra via biosintetica che sia responsabile del mantenimento dei livelli basali di tale mediatore: si ritiene che potrebbe entrare in gioco una fosfolipasi A1 (PLA1) che sia in grado di portare alla formazione di un lisofosfolipide che successivamente viene convertito in 2-AG da una liso-PLC. Per quanto concerne la biosintesi degli altri endocannabinoidi (noladinetere, NADA e virodamina), non vi sono dati rilevanti a riguardo: la sintesi della nolandietere sembra essere mediata da una via di segnalizzazione non dipendente da fosfolipidi ed indipendente dal Ca²⁺ (De Petrocellis et al., 2004). La NADA sembra essere prodotta, secondo quanto evidenziato da dati preliminari, grazie alla reazione tra dopamina e araquidonil-coenzima A (De Petrocellis et al., 2004). Invece la virodamina, che sembra accompagnare l'AEA in tutti i tessuti analizzati (Porter et al., 2002), si ipotizza che venga sintetizzata attraverso una trasformazione non enzimatica dalla N-acetiletanolamina nel suo corrispondente O-acil estere e viceversa (Markey et al., 2000).

Degradazione degli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi, una volta terminata la loro sintesi, vengono rilasciati nello spazio extracellulare in prossimità del sito di rilascio agendo come mediatori locali autocrini o paracrini interagendo rispettivamente con i recettori CB localizzati sulla stessa cellula nel primo caso e su cellule limitrofe nel secondo. Essi vengono definiti messaggeri retrogradi in quanto, una volta rilasciati dal terminale post-sinaptico andranno ad agire su quello pre-sinaptico (Wilson e Nicoll 2002). Conclusasi la loro azione biologica, gli endocannabinoidi vengono inattivati attraverso un meccanismo di "ricaptazione" (reuptake) tramite diffusione attraverso la membrana cellulare al

quale fa seguito l'idrolisi enzimatica e la riesterificazione dei prodotti di idrolisi nei fosfolipidi di membrana. Considerando ciascuno di questi passaggi d'inattivazione singolarmente, si può evidenziare come il meccanismo di ricaptazione degli endocannabinoidi sembra avvenire tramite un meccanismo di diffusione facilitata nel quale svolge un ruolo chiave un trasportatore di membrana (EMT) che lavora in entrambe le direzioni secondo il gradiente di concentrazione degli endocannabinoidi attraverso la membrana plasmatica. Inizialmente ci si domandava se questo trasportatore fosse selettivo per un endocannabinoide in particolare o fosse capace di agire su tutti gli endocannabinoidi rilasciati (Bisogno et al., 2001), ma evidenze sperimentali hanno dimostrato che esso medi la ricattura di tutti gli endocannabinoidi (Wilson e Nicoll, 2002). Nello specifico però, evidenze sperimentali hanno dimostrato che, utilizzando inibitori specifici del reuptake dell'AEA, si evidenzia lo stesso meccanismo anche per il 2-AG. Una volta che vengono riportati all'interno della cellula, l'AEA viene idrossilata in acido arachidonico ed etanolamina dall'azione della FAAH (Cravatt et al., 1996), enzima ancorato alla membrana che si trova preferenzialmente localizzata nelle zone somato-dendritiche dei neuroni (Vinod e Hungund, 2005) che sembra avere un ruolo importante anche nell'idrolisi del 2-AG. Quest'ultimo può essere idrolizzato anche dalle monoacilglicerolipasi (MAGL) che porta alla formazione di acido arachidonico e glicerolo (Piomelli, 2003).

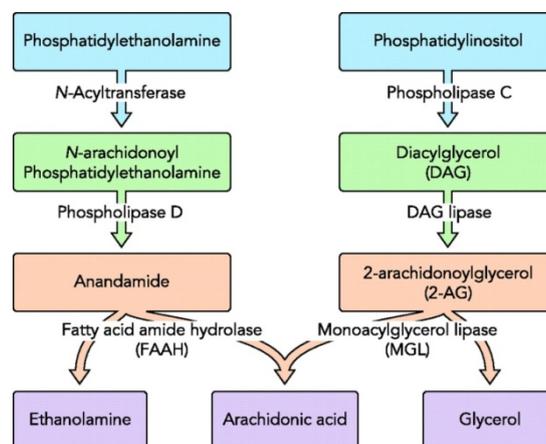


Fig. 7: sintesi e degradazione dei due cannabinoidi più conosciuti, anandamide (AEA) e 2-arachidonilglicerolo (2-AG) (Adattato da: El Manira and A. Kyriakatos, 2010)

Effetti fisiologici e farmacologici degli endocannabinoidi

Oggi è ampiamente dimostrato il coinvolgimento del sistema endocannabinoide in numerosi processi fisiologici e, la caratterizzazione sempre più esaustiva di queste proprietà, sta permettendo di sviluppare composti farmacologicamente attivi sui recettori cannabinoidi che possano essere utili per il trattamento di diverse patologie. Infatti è chiaro che, in alcune circostanze di “pericolo” per l’organismo, i cannabinoidi, essendo sintetizzati “*on demand*”, sono in grado di proteggerlo da alcune condizioni patologiche che potrebbero provocargli danni di diversa natura ed entità. A livello del sistema nervoso centrale, gli endocannabinoidi partecipano alla regolazione dell’attività motoria, della nocicezione, dell’assunzione di cibo, della temperatura corporea, dell’apprendimento e memoria così come nello sviluppo cerebrale (Piomelli, 2003), ed un ruolo rilevante lo esercitano anche a livello del sistema immunitario, cardiovascolare e della proliferazione cellulare.

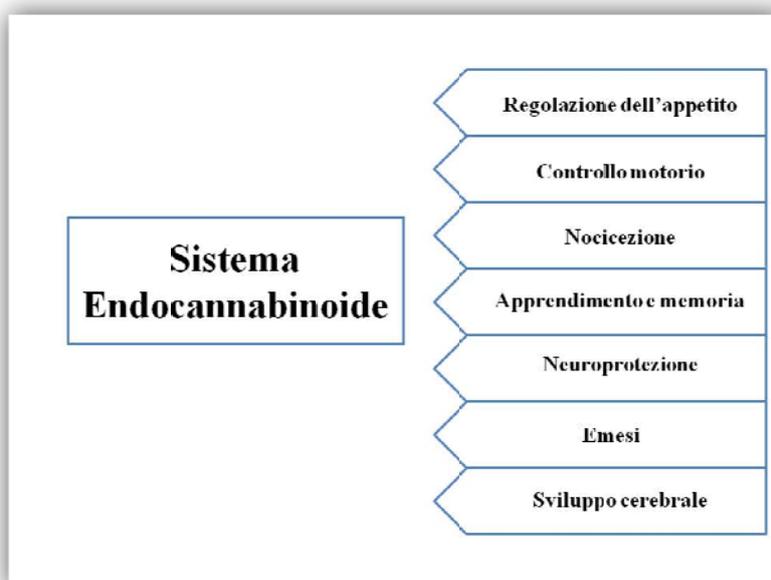


Fig. 8: Schematizzazione delle principali funzioni del sistema endocannabinoide endogeno

Controllo motorio

I cannabinoidi (endogeni, naturali o sintetici) producono un'inibizione dell'attività motoria in forma dose-dipendente esercitando un effetto definito "trifasico" (Romero et al., 1995). Il THC, somministrato a dosi molto basse riduce l'attività motoria spontanea, a dosi intermedie l'aumenta ed a dosi alte induce catalessia nei topi; la somministrazione dell'SR141716 reverte, in generale, questi effetti e produce un certo grado di iperlocomozione. L'alta densità dei recettori CB₁ a livello dei gangli della base e del cervelletto, aree cerebrali deputate al controllo motorio, dimostra un loro coinvolgimento nella modulazione psicomotoria (Herkenham et al., 1991). Inoltre, è stato riscontrata un'alterata funzione dei recettori CB₁, nelle aree precedentemente citate, sia in modelli animali che in pazienti affetti da differenti patologie neurologiche. Tali effetti sull'attività motoria sembrano essere imputabili all'azione inibitoria dei cannabinoidi sul rilascio di GABA e glutammato a livello delle terminazioni presinaptiche dei gangli della base e del cervelletto (Romero et al., 2002; Van der Stelt e Di Marzo, 2003).

Nocicezione

I cannabinoidi possiedono proprietà analgesiche che sono quelle più ampiamente descritte e studiate di questi composti. Si ritiene che gli endocannabinoidi prendano parte ad un sistema naturale di analgesia presente nell'organismo, mediato dai recettori CB₁ a livello del tronco encefalico (Wilson et al., 2002). La distribuzione anatomica dei recettori CB₁ coincide con aree cerebrali implicate nella trasmissione e modulazione nocicettiva a livello centrale come i gangli dorsali spinali e terminazioni periferiche di neuroni afferenti (Hohmann, 2002). In seguito a stimoli dolorosi, si evidenziano elevati livelli di endocannabinoidi nel tronco cerebrale ed è stato dimostrato che la somministrazione di antagonisti del recettore CB₁ produce iperalgesia mentre, al contrario, la somministrazione di agonisti CB₁ come Δ^9 -THC e CP 55,940 produce analgesia (Welch e Stevens, 1992). Inoltre il sistema endocannabinoide partecipa nella percezione del dolore a livello spinale e

nei terminali nervosi periferici. Il principale meccanismo coinvolto nel controllo analgesico sembra essere la modulazione di impulsi inibitori discendenti dal tronco al midollo spinale, come conseguenza di un blocco del rilascio presinaptico del GABA da neuroni situati nelle aree del tronco cerebrale implicate nella nocicezione (RVM-rostral ventromedial medulla; PAG-midbrain periaqueductal gray).

Apprendimento e memoria

L'effetto peggiorativo della marijuana sulla memoria è ben riconosciuto, suggerendo un'importanza notevole dei recettori cannabinoidi a livello dell'ippocampo. Infatti, l'ippocampo, coinvolto nei processi di apprendimento e memoria, costituisce una delle aree cerebrali dove si riscontra un'elevata densità di recettori CB₁. Numerose evidenze sperimentali hanno confermato che il consumo di Cannabis induce marcate alterazioni della memoria a breve termine simili a quelle riscontrate nella malattia di Alzheimer caratterizzata da degenerazione ippocampale. Si pensa che a questo livello gli endocannabinoidi inibiscono il rilascio di diversi neurotrasmettitori, quali GABA, glutammato e acetilcolina, e che la riduzione del rilascio di glutammato a livelli inferiori a quelli necessari per l'attivazione dei recettori della N-metil-D-aspartato (NMDA) sia responsabile della riduzione di memoria a breve termine osservata nelle intossicazioni da cannabis, essendo questi recettori implicati nella formazione della memoria. Uno studio recente ha dimostrato che gli endocannabinoidi promuovono la rimozione di ricordi spiacevoli grazie all'effetto inibitorio a livello dell'amigdala (Marsicano et al., 2002).

Effetto neuroprotettore

Il sistema endocannabinoide può svolgere un importante ruolo neuroprotettore in situazioni di danno neuronale acuto, traumi cranici, epilessia e patologie neurodegenerative croniche come la

sclerosi laterale amiotrofica, l'Alzheimer, il Parkinson e la corea di Huntington (Fernández-Ruiz et al., 2003; Baker e Pryce, 2003; Jackson et al., 2005; Ramos et al., 2005). I meccanismi che giustificano le proprietà protettive dei cannabinoidi possono essere differenti. I danni cerebrali acuti provocano la liberazione di amminoacidi eccitatori come il glutammato che attraverso l'interazione con i recettori NMDA producono l'entrata massiva di Ca^{2+} nella cellula inducendo la morte neuronale per citotossicità. Gli endocannabinoidi vengono prodotti in risposta a questo aumento massivo di concentrazione di calcio attivando i recettori CB_1 e portando alla riduzione della liberazione di glutammato e, quindi, riducendo il danno neuronale. Infatti è stato dimostrato che diverse condizioni di danno cellulare portano ad un aumento dei livelli di endocannabinoidi in diversi organi e tessuti così come a livello cerebrale (Hansen et al., 2000). I cannabinoidi classici, inoltre, grazie alla presenza nella struttura di gruppi fenolici, possiedono proprietà antiossidanti indipendenti dall'attivazione recettoriale CB_1 (Marsicano et al., 2002). Un altro meccanismo che potrebbe essere alla base dell'effetto neuroprotettore di questi composti è quello gli endocannabinoidi evitano la morte astrocitaria ed oligodendrocitaria (Molina-Holgado et al., 2002).

Effetto antiemetico

Il sistema degli endocannabinoidi ha un ruolo di primaria importanza nel controllo della nausea e del vomito, processi controllati da due aree cerebrali differenti: il bulbo e l'area postrema. I meccanismi antiemetici prodotti dai cannabinoidi non sono del tutto chiari anche se si è ipotizzato potessero essere recettore mediato. In differenti modelli animali si è dimostrato che l'inibizione del vomito prodotta dalla somministrazione di agonisti cannabinoidi era dovuta all'attivazione del recettore CB_1 : tali effetti erano riscontrati sia a livello del SNC nelle aree implicate nel vomito e nella nausea, dove tali recettori erano localizzati, ma anche nel sistema nervoso periferico con l'attivazione dei recettori CB_1 localizzati nell'intestino tenue (Van Sickle et al., 2001; Coutts e Izzo, 2004). Due diversi trial clinici che utilizzano i cannabinoidi come antiemetici, confermano che

questi composti possono essere utili nel trattamento della nausea e del vomito in seguito a chemioterapia antineoplastica (Tramer et al., 2001).

Cannabinoidi e regolazione del comportamento alimentare

Le prime evidenze a sostegno dell'azione oressizzante della *Cannabis Sativa* risalgono sin dai tempi più antichi, dove venne utilizzata come potente stimolatore dell'appetito. Quest'effetto è ben conosciuto dai consumatori di Cannabis che lamentano, in seguito alla sua assunzione, un appetito vorace, un desiderio persistente ed un aumento del piacere prodotto dall'ingestione di cibo. Attualmente, un enorme numero di evidenze sperimentali supportano il contributo del sistema endocannabinoide nel controllo del bilancio energetico e nella modulazione del comportamento alimentare, attraverso la regolazione di meccanismi sia centrali che periferici (Bisogno et al., 1999; Coutts e Izzo, 2004; Di Marzo and Matias, 2005). Di fatto, la manipolazione farmacologica di questo sistema attraverso la somministrazione sia di cannabinoidi esogeni, come il THC, sia di agonisti sintetici, come CP55940 e WIN 55212-2, determina un aumento del consumo di cibo sia nell'uomo che negli animali da laboratorio (Hollister, 1971; Williams et al., 1998; Koch, 2001; Hart et al., 2002, Cota et al., 2003; Dood et al., 2009). La capacità dei cannabinoidi di aumentare il consumo di cibo sembra essere legata all'attivazione dei recettori CB₁ presenti sia a livello ipotalamico che a livello del sistema mesolimbico (Di Marzo and Matias, 2005). In accordo con quanto appena enunciato, è stato dimostrato che il THC, gli endocannabinoidi ed inibitori della FAAH, sono in grado di aumentare il consumo di cibo in ratti sazi quando infusi localmente a livello ipotalamico (Anderson-Baker et al., 1979; Hao et al., 2000; Jamshidi and Taylor, 2001; Verty et al., 2005) e nel nucleo accumbens (Jamshidi and Taylor, 2001; Kirkham et al., 2002; Soria-Gómez et al., 2007). Diversi studi hanno confermato che questi effetti iperfagici sono mediati dall'attivazione dei recettori CB₁ in quanto sono bloccati dagli antagonisti/agonisti inversi come il rimonabant e l'AM251 (Kirkham et al., 2002; Soria-Gómez et al., 2007). D'altro canto, quando

somministrati da soli, gli antagonisti inducono un effetto ipofagico (nel quale si assiste ad una riduzione della quantità di cibo assunta attraverso la riduzione della frequenza, del numero e della durata del pasto) ed una diminuzione del peso corporeo (Carai et al., 2006). In forma del tutto simile, il fitocannabinoido Δ^9 -tetraidrocannabinivarina (THCV), che si comporta come un antagonista CB₁, riduce l'assunzione di cibo ed il peso corporeo se somministrato a basse dosi (Riedel et al., 2009). A conferma di ciò, topi privi del recettore CB₁ (CB₁-KO) si presentano magri ed ipofagici, indicando che il comportamento alimentare e l'acquisizione del peso corporeo dipendono dall'espressione e dall'attività funzionale di questi recettori (Wiley et al., 2005). Gli endocannabinoidi, essendo sintetizzati *on demand*, sono i mediatori ideali per rispondere in tempo reale alle continue variazioni degli stati nutrizionali dell'organismo: infatti aumentano significativamente nell'ipotalamo e nell'accumbens in seguito al digiuno e tornano a livelli normali dopo la rialimentazione non subendo però alcuna modificazione in altre aree cerebrali non implicate nel comportamento alimentare (Kirkham et al., 2002). L'utilizzo di modelli animali, ha permesso negli ultimi anni di ampliare le conoscenze riguardanti il coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi sia nella componente omeostatica che edonica del comportamento alimentare.

Cannabinoidi e regolazione omeostatica: neuropeptidi ed ormoni

Studi di localizzazione cerebrale hanno evidenziato una distribuzione dei recettori CB₁ a livello ipotalamico dove modulano, localmente, l'attività dei neuroni ipotalamici e, conseguentemente, influenzano il rilascio di neuropeptidi oressizzanti ed anoressizzanti. Cota e collaboratori (2003) hanno dimostrato che l'mRNA del recettore CB₁ è coespresso con l'mRNA codificante CRH, CART, MCH ed orexina/ipocretina. Utilizzando un modello ex-vivo di espanto ipotalamico di topo si è constatato che l'AEA ed il CP-55940 aumentano in modo significativo il rilascio di NPY, un effetto che viene bloccato dall'AM251. Inoltre, la somministrazione di AM251 di per sé inibisce il rilascio di NPY, confermando così il ruolo degli endocannabinoidi nel rilascio di questo peptide

oressigeno (Gamber et al., 2005). In accordo con questo, Poncelet e collaboratori (2003) hanno riportato che il rimonabant previene l'iperfagia indotta dalla somministrazione di NPY e l'abilità di questo peptide di stimolare il consumo di cibo è assente nei topi CB₁-KO. I topi deficitari della FAAH mostrano ridotti livelli di fibre nervose immunoreattive per il CART in diverse regioni ipotalamiche (ARC, DMH e PVN), che tornano ai livelli dei controlli wild-type (WT) dopo il trattamento con rimonabant (Osei-Hyiaman et al., 2005). Nei ratti a digiuno, il rimonabant riduce significativamente l'aumento dei livelli di ghrelina, mentre i livelli plasmatici di ghrelina in ratti sazi trattati con rimonabant, risultano essere del 35% inferiori se comparati con i rispettivi veicoli (Cani et al., 2004). Kola e collaboratori (2008), attraverso l'utilizzo della tecnica del patch-clamp, hanno dimostrato che la ghrelina inibisce gli inputs sinaptici eccitatori nel PVN e che questo effetto può essere abolito dalla somministrazione dell'AM251 o attraverso l'inibizione della sintesi dei cannabinoidi. Questi autori hanno inoltre dimostrato che sia il THC che la ghrelina aumentano l'attività della proteina chinasi AMP (AMPK), un enzima chiave nella regolazione dell'appetito e del metabolismo, nell'ipotalamo di topi WT rispetto ai topi CB₁-KO. Inoltre, la capacità della ghrelina di stimolare il consumo di cibo, quando somministrata localmente a livello ipotalamico, viene bloccata dal pre-trattamento con il rimonabant suggerendo che l'iperfagia indotta dalla ghrelina dipende dal fatto che il sistema endocannabinoide risulti essere intatto (Tucci et al., 2004). Così come è vero che gli endocannabinoidi nell'ipotalamo sono sotto il controllo negativo della leptina, anche la leptina ha dimostrato essere sotto il controllo degli endocannabinoidi. Infatti studi sperimentali evidenziarono che un trattamento acuto a base di leptina riduce i livelli ipotalamici di AEA nei topi normali ed, in topi resi obesi ed iperfagici da un difetto del segnale leptinergico, i livelli ipotalamici di endocannabinoidi sono permanentemente e patologicamente elevati (Di Marzo et al., 2001). In ratti subanoressici, dosi intracerebroventricolari di ossitocina, agonista del recettore per la melanocortina 4 (MCR4) o di rimonabant lavorano in sinergia per sopprimere il consumo di cibo (Verty et al., 2004).

Cannabinoidi ed aspetto edonico del cibo

Come precedentemente descritto, le aree cerebrali coinvolte nell'aspetto edonico del cibo sono principalmente localizzate nel circuito mesolimbico corticale, costituito da una sub-popolazione di neuroni dopaminergici che originano nella VTA e nella pars compacta della sostanza nigra e proiettano a diverse regioni, incluso il nucleo accumbens (NAcc) ed altre strutture limbiche come l'amigdala, l'ippocampo e la corteccia prefrontale, considerate di importanza fondamentale nei processi di rinforzo e della dipendenza da droghe (Wise e Rompre, 1989; Wise, 2009; Fields et al 2007). È stato ampiamente dimostrato che i cibi altamente palatabili, in maniera del tutto simile alle sostanze d'abuso, aumentano il rilascio di dopamina nella shell del NAcc (Martel e Fantino, 1996; Bassareo e Di Chiara 1997). Il sistema dopaminergico mesolimbico è strettamente collegato con i diversi nuclei dell'ipotalamo e diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che molte delle molecole presenti in questi nuclei, come ad esempio il NPY, l'orexina, la leptina, sono presenti anche a livello delle strutture mesolimbiche (NAcc, VTA, PFC) dove giocano un ruolo importante nella componente edonica dell'assunzione di cibo (Kelly et al., 2005; Monteleone e Maj, 2013; Meye e Adan 2013). Diverse sono le evidenze che supportano un ruolo del sistema endocannabinoide nella componente edonica del cibo. I recettori CB₁ sono localizzati nella VTA, nel NAcc ed in diverse aree che proiettano a queste due strutture come la corteccia prefrontale (PFC), l'amigdala centrale e l'ippocampo, dove sembrano rivestire un ruolo importante nella modulazione dei processi del piacere e di rinforzo (Gardner et al., 2005). Agendo come messaggeri retrogradi, gli endocannabinoidi sono in grado di modulare i segnali eccitatori ed inibitori che controllano i neuroni dopaminergici del sistema mesocorticolimbico (Wilson et al., 2001) attraverso l'attivazione dei recettori CB₁ posti a livello presinaptico sui terminali assonici dei neuroni GABAergici e glutammatergici nella VTA e nel NAcc (Melis et al., 2004; Lupica e Riegel, 2005). L'effetto finale sull'attività dopaminergica dipenderà dal livello d'attivazione di questi segnali (Lupica e Riegel, 2005). Vari studi, sia nell'uomo che negli animali, hanno evidenziato che gli

agonisti CB₁ aumentano l'assunzione di cibo ed in particolare il consumo di cibo altamente palatabile. In seguito al consumo di cannabis nell'uomo, alcune testimonianze evidenziano come sia presente un aumento dell'assunzione di cibo con una predominanza di quello ricco in grassi e zuccheri (Foltin et al., 1986; Foltin et al., 1988). Nei ratti, basse dosi di THC aumentano l'assunzione di cibo altamente palatabile sia dopo somministrazione centrale che periferica (Koch and Matthews, 2001). Un'altra evidenza del ruolo importante che rivestono gli endocannabinoidi nella componente edonica del cibo è evidenziata dalla capacità del CP-55,940 di facilitare l'assunzione di cibo palatabile quando somministrato nel romboencefalo (Miller et al., 2004). Inoltre, l'infusione diretta di 2-AG e di AA-5HT, inibitore della FAAH, nel nucleo parabranchiale di ratto stimola selettivamente il consumo di cibi altamente palatabili, mentre entrambi i composti non sono in grado di modificare l'assunzione di cibo standard (Dipatrizio e Simansky, 2008). Al contrario, gli antagonisti CB₁ riducono l'assunzione di cibo, riducendo preferenzialmente il consumo di cibo altamente palatabile. Ad esempio, il rimonabant riduce in maniera più efficace il consumo di cibi altamente palatabili rispetto al cibo standard (Arnone et al., 1997; Simiand et al., 1998), oltre che ridurre la preferenza per il sucrosio e le proprietà di rinforzo del cioccolato (Chaperon et al., 1998). South e collaboratori hanno dimostrato che la somministrazione dell'AM251 in topi posti davanti alla scelta fra due diete, una ricca ed una povera in grassi, riduce selettivamente il consumo del cibo ricco in grassi. Usando un modello di sovralimentazione caratterizzato da un accesso continuo al cibo standard da laboratorio e da un accesso limitato durante alcune ore al giorno ad un cibo altamente palatabile, (una mousse ricca in grassi ed in zuccheri), si è evidenziato che sia il rimonabant (7 giorni) che l'AM251 (15 giorni) riducono specificatamente il consumo del cibo altamente palatabile (Mathes et al., 2008). Inoltre, microiniezioni di AEA nella zona mediale della shell del NAc raddoppiano il numero di reazioni positive di "liking" suscitato dall'assunzione orale di saccarosio senza però alterare quelle negative

prodotte dall'assunzione del chinino amaro (Mahler et al., 2007). Inoltre è stato dimostrato che topi CB₁ KO consumano meno sucrosio di quelli wild type (Wiley et al., 2005).

Ruolo del sistema endocannabinoide nel BED

Dati presenti in letteratura evidenziano il ruolo chiave che il sistema endocannabinoide svolge nei meccanismi che regolano l'assunzione di cibo, il bilancio energetico e la gratificazione. Negli ultimi anni, evidenze cliniche e precliniche hanno permesso d'ipotizzare che esista una connessione fra le disfunzioni del sistema endocannabinoide ed i disturbi alimentari. Infatti, a supporto di questa ipotesi, uno studio importante sviluppato da Monteleone e collaboratori (2005) dimostrò come i livelli di AEA in pazienti donne affette da AN e BED fossero significativamente superiori rispetto quelli presenti in donne affette da BN e rispetto ai soggetti sani. Al contrario, le concentrazioni circolanti dell'altro endocannabinoide, il 2-AG, non differivano significativamente fra i gruppi di pazienti considerati. Inoltre, in questo stesso lavoro sono anche stati valutati i livelli di leptina e, come precedentemente descritto dallo stesso gruppo di ricerca (Monteleone et al, 2002), i livelli circolanti di questo ormone erano drasticamente ridotti nelle pazienti affette da AN e significativamente aumentati negli individui affetti da BED, ma non si evidenziavano cambi significativi di tale ormone nelle donne affette da BN. Quindi l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di AEA nelle pazienti anoressiche potrebbe essere secondario al deficit di leptina in quanto è stato dimostrata l'esistenza di una modulazione negativa della leptina sulla produzione degli endocannabinoidi e viceversa (Di Marzo et al., 2001).

Al contrario, l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di AEA nelle pazienti obese con BED potrebbe essere imputabile ad una disfunzione del segnale mediato da questo ormone come precedentemente dimostrato per l'obesità. Una delle plausibili spiegazioni del perché nelle pazienti affette da BN non è stata riscontrata una variazione dei livelli plasmatici di endocannabinoidi

potrebbe quindi essere imputabile alla mancata disregolazione del segnale della leptina. Come descritto precedentemente, vista la capacità dell'AEA di indurre un aumento del consumo di cibo, l'aumento di questo endocannabinoide nelle pazienti anoressiche potrebbe rappresentare un segnale di fame in risposta al digiuno continuato mentre nelle pazienti con BED potrebbe essere responsabile dell'eccessivo introito calorico. Inoltre, gli autori hanno ipotizzato che i livelli elevati di AEA possono facilitare il meccanismo di rinforzo e gratificazione prodotto dai comportamenti alimentari aberranti presenti in questi disturbi. Infatti, nelle anoressiche, gli elevati livelli di AEA potrebbero alleviare le conseguenze del digiuno e contribuire al mantenimento della restrizione alimentare a cui si sottopongono poichè consolidano il piacere prodotto da questa condizione. A differenza di ciò che accade per l'anoressia, nel BED gli elevati livelli di AEA possono rappresentare uno stimolo all'eccessivo consumo di cibo altamente palatabile mantenendo ed autoalimentando così le abbuffate. La limitazione di questo lavoro è che non si sa quanto i livelli periferici di endocannabinoidi che sono stati analizzati potrebbero riflettere quelli a livello del sistema nervoso centrale. Un altro aspetto investigato dal gruppo di Monteleone e collaboratori (2008), è stato quello di valutare se fosse presente un'associazione tra il BED ed il singolo polimorfismo nucleotidico (cDNA 385C ad A) del gene codificante per la FAAH (Sipe et al., 2002). Nei soggetti che presentano tale polimorfismo l'attività enzimatica della FAAH risulta ridotta di almeno il 50% rispetto ai soggetti wild-type e potrebbe essere responsabile a sua volta di una riduzione dell'inattivazione dell'AEA spiegando così l'aumento dei livelli plasmatici di questo endocannabinoide nei soggetti obesi con BED (Chiang et al., 2004). La distribuzione del polimorfismo in questione venne valutata in 115 pazienti obesi con BED, 74 obesi senza BED e 110 controlli sani. Sulla base dei dati ottenuti, tuttavia, è stato dimostrato che il polimorfismo in questione non fosse associato specificatamente al BED ma piuttosto all'obesità dal momento che i pazienti obesi senza BED presentavano una maggiore incidenza di questo polimorfismo rispetto a quelli con BED ed ai controlli sani.

Modelli animali di BED

I modelli animali sono importanti strumenti che permettono di approfondire e capire la neurobiologia che sta alla base dello sviluppo di numerosi disturbi neuropsichiatrici tra cui quelli del comportamento alimentare. Come precedentemente descritto, l'eziologia di questi disturbi non è ancora ben conosciuta e diversi fattori come quelli genetici, biologici, ambientali e psicologici interagiscono tra loro favorendo l'insorgenza di queste malattie. Data la complessa natura dei disturbi alimentari, i modelli animali correntemente utilizzati riproducono solo alcuni tratti che li caratterizzano. Specificatamente per il BED, nell'animale da laboratorio è possibile riprodurre il comportamento di binge eating, quindi un consumo eccessivo di cibo in un breve periodo di tempo come definito per la condizione umana, mettendo a disposizione dello stesso del cibo altamente palatabile con diverse modalità di accesso e in diverse condizioni sperimentali. Ad oggi, differenti modelli animali vengono utilizzati per riprodurre il comportamento di binge eating. Il primo modello è quello definito di "accesso limitato" nel quale il comportamento di binge eating è indotto utilizzando un regime di accesso intermittente (3 giorni/settimana) e limitato (2h) ad un cibo particolarmente appetibile per gli animali durante diverse settimane in aggiunta ad un accesso continuo di cibo standard ed acqua. Gli animali che sviluppano il comportamento di binge eating assumono una quantità di cibo altamente palatabile significativamente superiore a quella degli animali con un accesso giornaliero allo stesso e questo comportamento si mantiene stabile per lunghi periodi di tempo (Corwin e Buda-Levin, 2004; Corwin et al. 2011). In questo modello gli animali non vengono mai sottoposti a digiuno e questo rispecchia la condizione umana nella quale gli episodi di binge non sono guidati dal senso di fame (Zocca et al., 2011; APA, 2013). Inoltre, il comportamento di binge verso un cibo altamente palatabile che non è sempre disponibile per l'animale, è in linea con l'ipotesi che l'uomo sviluppa una compulsività verso cibi altamente palatabili nei confronti dei quali si autoimpongono una restrizione (*"forbidden foods" hypothesis*; Guertin et al., 1999).

Un altro modello è quello basato su una storia di dieta e stress (Hagan et al. 2002). La dieta è basata su cicli di restrizione di cibo seguiti da rialimentazione che consiste nell'accesso per 2 giorni ad un cibo palatabile dato in concomitanza con il cibo standard da laboratorio seguiti da 4 giorni in cui gli animali venivano alimentati solo con cibo standard ad libitum. Al termine di ciascun ciclo, gli animali ricevono uno stress (scossa elettrica) giusto prima del test alimentare nel quale hanno a disposizione il cibo palatabile e chow ad libitum. Durante la fase di rialimentazione, gli animali sottoposti ad entrambe le condizioni di dieta e stress, consumano molto più cibo palatabile rispetto a quelli sottoposti alla sola dieta o al solo stress. Infine, esiste un modello animale nel quale gli animali mantenuti giornalmente sotto una condizione di deprivazione di cibo di 12 ore, seguita da una rialimentazione (12 h) con una soluzione del 10% di sucrosio e chow, evidenziano un escalation giornaliera del consumo di questa soluzione (Avena et al. 2008).

OBIETTIVI DEL PRESENTE STUDIO

In studi effettuati precedentemente nei nostri laboratori, abbiamo dimostrato che una modulazione positiva del sistema endocannabinoide, mediante la somministrazione sia del THC, agonista naturale CB₁/CB₂, che dell'URB597, l'inibitore dell'enzima FAAH responsabile della degradazione dell'AEA, non modifica in maniera sostanziale il comportamento di ricerca compulsiva nei confronti del cibo appetibile (margarina) in un valido modello animale di BED (Corwin et al., 1998; Scherma et al., 2013) (Fig. 9).

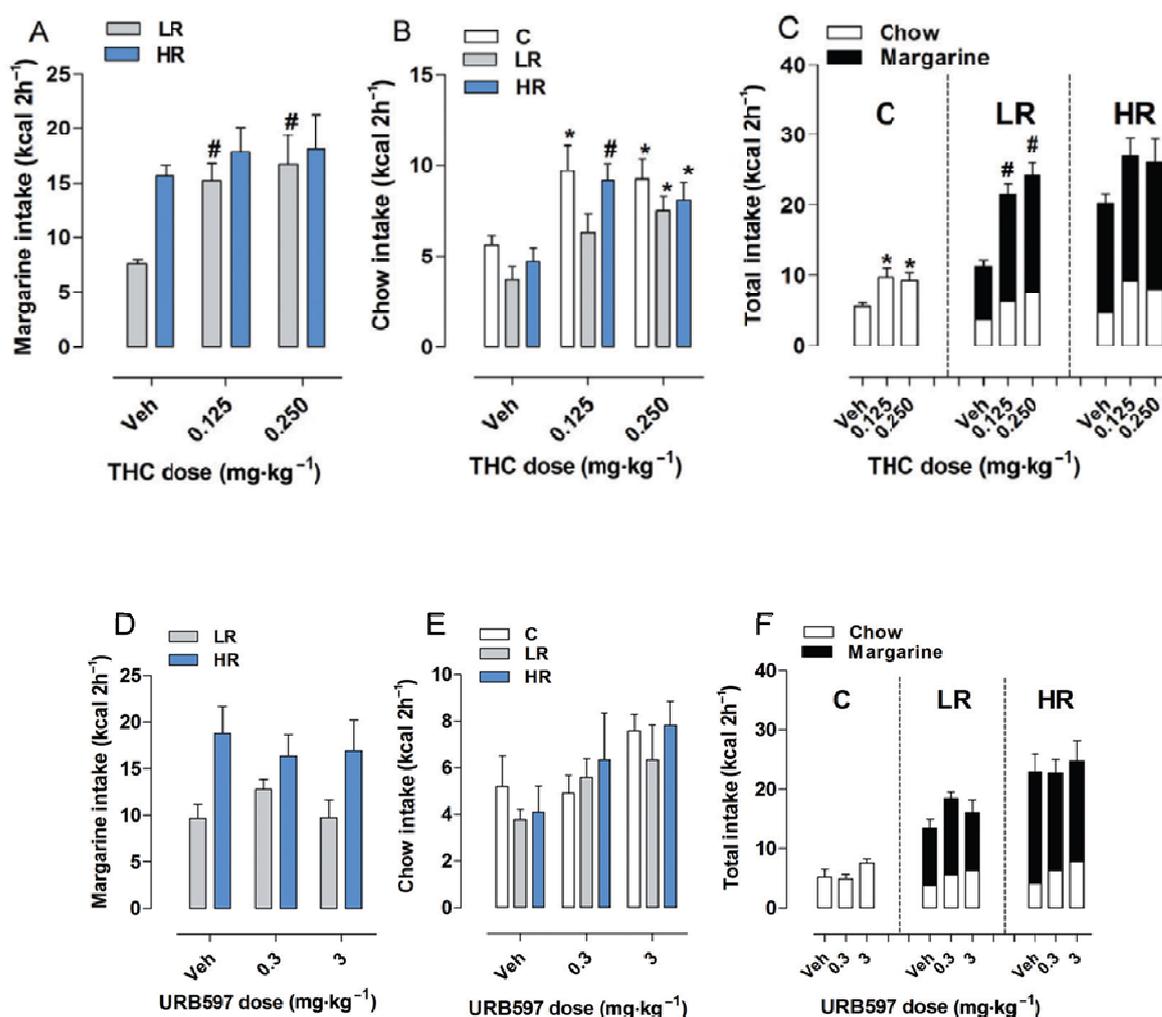


Fig. 9: I dati sono espressi come MEDIA ± SEM delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante 2 h di sperimentazione dopo trattamento con THC (* P < 0.05, # P < 0.01 vs Veh).

Al contrario, una modulazione negativa del sistema endocannabinoide attuata mediante il blocco farmacologico del recettore CB₁ con il rimonabant, antagonista/agonista inverso CB₁ ha mostrato che questo farmaco è in grado di bloccare l'assunzione compulsiva della margarina nel gruppo di animali mostranti il comportamento di binge eating in maniera dose-dipendente (Fig. 10).

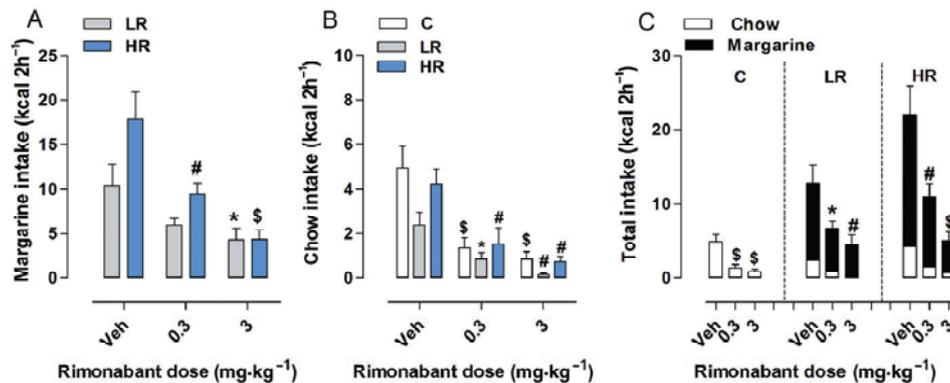


Fig. 10: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante 2 h di sperimentazione dopo trattamento con Rimonabant (* P < 0.05, # P < 0.01 e \$P < 0.001 vs Veh).

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che alcune condizioni alimentari (componenti alimentari specifici, nonché un'alimentazione compulsiva o una dieta restrittiva) influenzano l'espressione dei recettori CB₁ in diverse aree cerebrali. Ad esempio diversi studi hanno dimostrato che in ratti o in topi esposti ad una dieta ad alto contenuto calorico (come grassi e zuccheri) per diverse settimane evidenzia una significativa riduzione della densità dei recettori CB₁ in diverse aree cerebrali implicate nel controllo omeostatico ed edonico del cibo (Harrold et al., 2002; South et al. 2008; Timofeeva et al., 2009). Il coinvolgimento dei recettori CB₁ nel controllo del comportamento alimentare è stato ampiamente dimostrato, mentre quello dei recettori CB₂ non è stato del tutto chiarito. A tal riguardo, dati contrastanti dimostrano che, in alcuni casi, la somministrazione di antagonisti CB₂ non induce nessuna modificazione nell'assunzione di cibo standard da laboratorio mentre in altri la somministrazione intracerebroventricolare produce un aumento dell'assunzione di cibo (Emaidi et al., 2011). Inoltre, sulla base della letteratura recente, è stato dimostrato che tali recettori sono implicati nei processi di reward delle sostanze d'abuso

(Onaivi, 2011). L'AEA appartiene alla famiglia delle aciletanolamidi. Un altro membro di questo gruppo di lipidi è l'OEA che riveste un ruolo importante nel bilancio energetico promuovendo la sazietà e la lipolisi attraverso l'attivazione dei recettori PPARs (Fu et al., 2005). Questa molecola ha un effetto anoressizzante inducendo l'espressione di ossitocina nel PVN dell'ipotalamo ed, in accordo con quanto appena detto, risultati clinici preliminari hanno evidenziato livelli di OEA alterati nel liquido cerebrospinale e nel plasma di soggetti affetti da disturbi alimentari (Gaetani et al., 2008). Queste osservazioni potrebbero permettere di ipotizzare un coinvolgimento più generale del gruppo delle aciletanolamidi piuttosto che ritenere che i disturbi del comportamento alimentare siano dovuti solamente ad alterazioni dei livelli di endocannabinoidi.

In base a quanto appena descritto, l'obiettivo di questa tesi è stato quello di proseguire gli studi per valutare il coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi nell'eziopatologia del BED. Per il raggiungimento di tale obiettivo è stato utilizzato un modello sperimentale di binge eating validato dalla letteratura internazionale, descritto da Corwin e collaboratori (1998). Questo modello, utilizza un protocollo sperimentale nel quale gli animali sono sottoposti ad un regime di accesso limitato ad un cibo altamente palatabile ad alto contenuto calorico (margarina) e particolarmente appetibile per gli animali. Questo tipo di paradigma non pone mai gli animali di fronte a condizioni di alimentazione svantaggiate poiché essi hanno accesso al cibo standard ed all'acqua in forma illimitata, ciò che viene limitato è solo l'accesso alla margarina. Questo modello possiede numerosi vantaggi tra cui l'elevata validità isomorfica e la semplicità d'attuazione. In particolare i miei esperimenti sono proceduti in tre fasi ben precise: la prima era basata sull'allestimento e l'induzione del comportamento alimentare di binge eating secondo le linee della letteratura. Inoltre, sempre in questa fase, è stato importante valutare e caratterizzare i fenotipi comportamentali nelle ratte mostranti il comportamento di binge eating attraverso specifici test comportamentali. Concretamente, è stato valutato come primo parametro comportamentale quello dell'attività motoria per verificare se durante la fasi che precedevano e seguivano l'accesso alla margarina ci fossero

delle risposte comportamentali diverse tra i vari gruppi sperimentali. Durante l'attività motoria è stata valutato anche il tempo che l'animale ha trascorso nel centro della gabbia per evidenziare uno stato ansioso. Il passo successivo è stato quello di ricercare l'eventuale presenza di un fenotipo depresso ed ansioso valutandoli nelle due fasi del protocollo sperimentale sopracitate, partendo dal presupposto che, nei soggetti affetti da BED, tendono ad evidenziarsi problematiche di ordine psichiatrico come patologie depressive, ansiose e maniaco-ossessivo compulsivo

La seconda fase è stata incentrata sul proseguimento degli studi precedentemente effettuati nel nostro laboratorio, commentati nelle premesse, allo scopo di ampliare le conoscenze relative al coinvolgimento di tale sistema nell'eziopatogenesi di tale disturbo.

Quindi, per meglio comprendere il possibile ruolo del sistema endocannabinoide, sul comportamento di binge eating è stato valutato:

1. l'effetto in acuto dell'agonista CB_1/CB_2 WIN 55,212;
2. l'effetto in acuto del cannabinoide naturale non psicoattivo cannabidiolo (CBD);
3. l'effetto della somministrazione acuta del JZL 184, inibitore selettivo delle monoacilglicerolipasi (MAGL), enzima responsabile della degradazione del 2AG;
4. l'effetto della somministrazione cronica di rimonabant alla dose minima efficace testata per valutare se i risultati ottenuti durante il trattamento in acuto sul comportamento di binge eating potessero essere mantenuti anche nel cronico;
5. l'effetto della somministrazione acuta dell'AM630, antagonista CB_2 , ipotizzando un eventuale coinvolgimento dei recettori CB_2 in tale disturbo alimentare.

L'ultima fase si è focalizzata sugli studi di localizzazione recettoriale tramite la tecnica dell'autoradiografia di tipo quantitativo al fine di verificare se l'espressione dei recettori CB_1 potesse risultare modificata negli animali mostranti il comportamento di binge eating in aree cerebrali implicate nella regolazione del comportamento alimentare ed in quelle coinvolte nei meccanismi di rinforzo.

MATERIALI E METODI

Animali

In questo studio sono state utilizzate ratte femmine del ceppo Sprague-Dawley (Harlan-Nossan, Milano) di circa 60-65 giorni d'età e con un peso iniziale di circa 200g . Dopo la prima settimana di acclimatazione, gli animali sono stati stabulati in gabbie singole, mantenuti a ciclo invertito giorno/notte di 12h (luce off: 12:00), in condizioni ambientali standard (21 ± 2 °C, 60% di umidità), con cibo standard (chow 2.9 /kcal/g) e acqua ad libitum. Tutti gli esperimenti ed i relativi protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Cagliari, e condotti in accordo con la normativa CEE per l'uso degli animali da esperimento (CEE N°86/609).

Tipologia Di Dieta

Durante la sperimentazione sono state utilizzate due tipi di diete:

1. **cibo standard da laboratorio** (Chow Safe, France) costituito da: 3% kcal di grassi, 61% kcal di carboidrati e 16% kcal da proteine, 20% moisture, per un totale di 2.9 kcal per grammo.
2. **margarina** (Gradina Unilever Italia Mkt.) costituito da: 70% kcal di grassi, <1% kcal di carboidrati, per un totale di 6.5 Kcal per grammo.

Induzione del comportamento di binge eating

L'utilizzo degli animali è avvenuto dopo una settimana dal loro arrivo per consentirgli un'adeguata acclimatazione. Nei nostri esperimenti sono state utilizzate ratte femmine perché i disturbi alimentari, negli umani, hanno un'incidenza maggiore nelle donne rispetto ai maschi (Hudson et al., 2007). In seguito alla settimana di abituamento allo stabulario, gli animali sono stati sottoposti ad un regime di accesso limitato ed intermittente ad una dieta vegetale ad alto contenuto calorico (margarina) (Corwin et al., 1998; Corwin e Buda-Levin, 2004).

Gli animali, sono stati suddivisi in tre gruppi sperimentali:

1. **Low-restriction (LR)**: accesso continuo a cibo standard ed acqua. In aggiunta, gli animali hanno avuto accesso alla margarina per 2 ore (2h), tutti i giorni della settimana 3 h prima dell'inizio della fase di buio.
2. **High-restriction (HR)**: accesso continuo al cibo standard ed all'acqua. In aggiunta, gli animali hanno avuto accesso alla margarina per 2 ore (2h) per 3 giorni alla settimana (lunedì, mercoledì e venerdì).
3. **Controlli (C)**: accesso continuo a cibo standard ed acqua senza mai accedere alla margarina.

Tutti i gruppi sperimentali sono stati monitorati mediante la misurazione del consumo del cibo totale (margarina e cibo standard) nelle 2 ore di accesso limitato tutti i lunedì, mercoledì e venerdì. Una volta a settimana è stata fatta la valutazione del peso corporeo di tutti gli animali dei diversi gruppi sperimentali per valutare se fosse riscontrabile una variazione significativa del peso corporeo tra di essi.

Farmaci

Gli esperimenti condotti in questa tesi hanno previsto l'utilizzo delle seguenti sostanze:

1. **WIN 55,212-2** (1 e 2 mg/kg/ml; Tocris, UK): disciolto in una soluzione contenente 2% Tween80 e 98% soluzione salina e somministrato per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'inizio dell'episodio di binge.
2. **JZL184** (4, 8 mg/kg/ml; Cayman chemical, Cabru, IT): disciolto in una soluzione contenente 20% DMSO ed 80% di cremophor, etanolo e salina in proporzione 1:1:8, e somministrato per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'inizio dell'episodio di binge.
3. **Rimonabant** (SR 171416A)(0.3 mg/kg/ml; National Institute on Drug Abuse, NIH, Baltimore, MD, USA): disciolto in una soluzione contenente 2% Tween 80, 2% etanolo e

96% di salina, e somministrato per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'inizio dell'episodio di binge per tre settimane di trattamento.

4. **Cannabidiolo (CBD)** (10 e 20 mg/kg/ml; Cayman chemical, Cabru, IT): disciolto in una soluzione contenente 10% DMSO ed 2% di Tween80 e 98% salina, e somministrato per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'inizio dell'episodio di binge
5. **AM630** (2.5, 5 mg/kg/ml; Cayman chemical, Cabru, IT): disciolto in una soluzione contenente 10% DMSO ed 10% di Tween80 e 80% salina, e somministrato per via intraperitoneale 30 minuti prima dell'inizio dell'episodio di binge.
6. **Oleiletanolamina (OEA)** (2.5, 5 mg/kg/2ml Tocris, UK): disciolto in una soluzione contenente 5% Tween80 e 95% soluzione salina, e somministrato per via intraperitoneale a 24h, 4h e 10 minuti dall'inizio dell'episodio di binge.
7. **Palmitoiletanolamina (PEA)** (1, 2 mg/kg/ml; Abcam Biochemicals, UK): disciolto in una soluzione contenente 5% Tween80 e 95% soluzione salina, e somministrato per via intraperitoneale a 24h, 4h e 10 minuti dall'inizio dell'episodio di binge.
8. **Clofibrato** (12.5 e 25 mg/kg/ml; Tocris, UK): disciolto in una soluzione contenente 20% DMSO ed 10% di Tween80 e 70% salina, somministrato per via intraperitoneale 1h prima dell'inizio dell'episodio di binge.

Il gruppo degli animali di controllo è stato sottoposto a somministrazione del veicolo corrispondente al farmaco in esame in ogni singolo trattamento per indurre nell'animale lo stesso stress provocato dall'iniezione.

ANALISI COMPORTAMENTALE

Tutti i test sono stati eseguiti nella fase di PRE-binge cioè un'ora mezza prima dell'episodio di binge e nella fase di POST-binge cioè un'ora e mezza dopo lo stesso.

Test dell'attività motoria (LA)

L'attività motoria spontanea è un comportamento naturale comune ad ogni essere vivente: essa risponde a delle motivazioni che sono diverse da specie a specie. Nei roditori, viene registrata in laboratorio attraverso l'utilizzo di svariati test, tra questi il Motility Meter che sfrutta la loro naturale attitudine all'esplorazione dell'ambiente che li circonda. L'alterazione dell'attività motoria può essere causata da molteplici fattori quali la sedazione, l'eccitazione, uno stato conflittuale, atassia ecc. Quindi, questo test comportamentale, viene utilizzato principalmente per testare l'attività sedativa o eccitatoria dei farmaci anche se nel nostro caso ci è stato utile per evidenziare, se fossero presenti, modificazioni dell'attività motoria in relazione al tipo di dieta alla quale erano sottoposti gli animali.

L'apparato utilizzato è costituito da un Digiscan Animal Activity Analyser (Omnitech Electronics, Columbus, USA) collegato ad una serie di gabbie (42 × 30 × 60 cm), ognuna delle quali è dotata 16 fotocellule localizzate sui quattro lati della gabbia, ad una distanza di 2.5 cm l'una dall'altra: esse sono disposte in un numero di 16 per ognuna delle tre coordinate spaziali x, y e z ed hanno la capacità di emettere raggi infrarossi in senso orizzontale e verticale permettendo di registrare la posizione e di individuare gli spostamenti dell'animale nella gabbia tramite cellule ad infrarossi.

Il programma è inoltre in grado di seguire anche gli spostamenti verticali ed i movimenti rotatori.

Complessivamente i parametri che sono stati monitorati sono stati:

1. *distanza totale percorsa*: distanza orizzontale totale percorsa dall'animale, misurata in centimetri (cm);

2. *attività al centro e ai margini*: numero totale di interruzioni di emissione dei raggi infrarossi, captate dai sensori agli angoli, quando l'animale si trova ad una distanza di 8 e 2 cm (centro e margini, rispettivamente) dai margini della gabbia.

Gli animali, sono stati posizionati singolarmente nelle gabbie in plexiglass e lasciati al loro interno per un periodo di 60 minuti: i dati ottenuti sono stati considerati sia come curva temporale (valori raccolti in intervalli di 10 minuti) che come dati cumulativi (media della somma dei valori valutati ogni 10 minuti, per animale, per gruppo, all'interno della sessione di 60 minuti). Al termine del test, gli animali sono stati riposti nelle gabbie di appartenenza ed i box puliti accuratamente prima dell'introduzione dei successivi animali con H₂O₂ in modo da limitare ogni possibile traccia olfattiva.

Elevated plus maze (EPM)

L'elevated plus-maze è un test comportamentale che permette di valutare lo stato ansioso di un animale basandosi sulla naturale avversione dei roditori per gli spazi aperti, sfruttando anche il conflitto che si instaura nell'animale di fronte alla scelta dell'esplorazione di tali spazi (condizione sfavorevole) ed il loro istinto di esplorazione dei nuovi ambienti (condizione favorevole). L'apparato è fabbricato in cloruro di polivinile nero e consiste in un labirinto a forma di croce costituito da quattro bracci uguali a due a due: due bracci "chiusi" (50 cm x 10 cm) sul perimetro da pareti scure alte e due bracci "aperti" (50 cm x 10 cm) privi di tali pareti, connessi fra loro da un quadrato centrale (12cm x 12cm) che serve da punto di inizio per il test (start point). L'apparato è sollevato 50 cm da terra e posizionato all'interno di una stanza silenziosa nella quale viene utilizzata una luce attenuata di circa 50/60 lux (non avversiva per gli animali) senza alcun riferimento visivo che possa modificare il comportamento dell'animale sottoposto al test.

Il giorno dell'esperimento, gli animali sono stati abituati alla stanza almeno 1h prima dell'inizio del test, che ha avuto una durata totale di cinque minuti. Tale metodica permetterà all'animale di

abituarsi ad un ambiente nuovo evitandone uno sconvolgimento comportamentale che renderebbe difficile l'esecuzione dell'elevated plus maze.

Il test è iniziato nel momento in cui l'animale è stato posizionato al centro del labirinto, nello start point, con il muso rivolto verso uno dei due bracci aperti: l'animale è stato lasciato libero di esplorare l'apparato per un tempo totale di cinque minuti durante i quali tutti i movimenti sono stati registrati da una telecamera, collegata ad un sistema computerizzato (ANY MAZE videotracking di UGO BASILE) , posta al di sopra del labirinto.

Complessivamente i parametri che sono stati monitorati sono stati:

1. *tempo trascorso nei bracci aperti* : valutato in secondi.
2. *tempo trascorso nei bracci chiusi* : valutato in secondi.
3. *numero di entrate nei bracci aperti e nei bracci chiusi*: l'entrata viene considerata come l'attraversamento dell'animale dello start point per entrare nel braccio aperto o nel braccio chiuso con tutte e quattro le zampe. L'animale si considera al di fuori del braccio chiuso o aperto quando con solo due zampe oltrepassa la linea che delimita lo start point.
4. *numero di entrate totali*: è la sommatoria delle entrate nei bracci aperti con quelle nei bracci chiusi

Questi parametri sono stati usati per calcolare gli indici comportamentali correlati all'ansia, definiti come **percentuale di tempo trascorso nei bracci aperti** ($[\text{tempo nel braccio aperto} / \text{tempo totale}] \times 100$) e la **percentuale di entrate nei bracci aperti** ($[\text{entrate nell'aperto} / \text{entrate totali}] \times 100$). Più basso risulta tale rapporto, più l'animale è ansioso durante il test.

Forced swimming test (FST)

Il forced swimming test viene definito come il “ test del comportamento disperato” la cui procedura è ampiamente descritta in letteratura (Porsolt et al. 1977, 1978). Esso consiste nell’immergere individualmente l’animale in un ambiente ristretto, un cilindro di plexiglass dell’altezza di circa 40 cm e del diametro di 20 cm, riempito di acqua alla temperatura di $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, dal quale non esiste possibilità di fuga.

Il protocollo sperimentale di questo test comportamentale consta principalmente di due fasi: la prima definita fase di training, 24 ore prima del test, nella quale gli animali sono stati sottoposti, ad una sessione di nuoto forzato della durata di 15 minuti; questa fase fa sì che l’animale si abitui alle condizioni sperimentali (le stesse che verranno riproposte nella fase del test).

La seconda è la fase del test: i ratti sono stati nuovamente introdotti nell’acqua del cilindro per 5 minuti, 24h dopo il training, con le stesse condizioni sperimentali della prima fase. L’intera sessione viene registrata tramite sistema di videocamere digitali e rispettivo software (Anymaze Software, Stoelting).

In questo test comportamentale, l’animale si trova costretto a nuotare in uno spazio molto ristretto senza via di fuga, ed inizialmente tenta di rimanere a galla: dopo tale breve periodo di iperattività, gli animali adottano una posizione immobile caratteristica e non tentano più di scappare. Questo parametro di immobilità nell’acqua è stato associato ad una situazione di tono dell’umore depresso, chiamato anche “comportamento di disperazione”.

Complessivamente i parametri che sono stati monitorati in questo test sono stati:

1. *Immobility*: tempo trascorso dall’animale (valutato in secondi) nel permanere nel comportamento di immobilità nell’acqua facendo solo alcuni minimi movimenti con le zampe anteriori in modo da mantenere il capo sopra il livello dell’acqua;
2. *Swimming*: tempo trascorso dall’animale (valutato in secondi) in movimenti orizzontali sulla superficie dell’ acqua;

3. *Climbing*: tempo trascorso dall'animale (valutato in secondi) in movimenti verticali sulla superficie dell' acqua;

STUDI DI BINDING

Preparazione del tessuto cerebrale

I ratti sono stati sacrificati subito dopo aver terminato l'episodio di binge eating. I cervelli sono stati rapidamente prelevati, immersi in isopentano e conservati a -80 °C prima di essere preparati ed utilizzati per gli studi autoradiografici.

Autoradiografia con [3H](-)-CP55940

Le sezioni coronali di cervello dello spessore di 14-16 µm, sono state ottenute utilizzando un criostato (Leica C3050S). Tali sezioni sono state montate su vetrini Superfrost Plus slides (BDH, Lutterworth, UK) e, successivamente, conservate alla temperatura di -20 °C in attesa di essere utilizzate per gli esperimenti di autoradiografia. Le aree cerebrali considerate ed analizzate in questi esperimenti, secondo l'Atlante Paxinos e Watson (1997), sono state :

1. corteccia cingolata 1 e 3 (Cg1 e Cg3) (AP: + 3.2)
2. caudato putamen (CPu) (AP: +1.60)
3. nucleus accumbens core (NAcc Core) e shell (NAcc Shell) (AP: +1.60)
4. corno d'Ammon 1, 2, 3 dell'ippocampo (CA1, CA2, CA3) (AP: -2.14)
5. giro dentato dell'ippocampo (DG) (AP: -3.14)
6. amigdala (AMY) (AP: da -2.14 a -3.14)
7. ipotalamo ventromediale (VMH) (AP: -2.14)
8. ipotalamo laterale (LH) (AP: -2.14)

Gli esperimenti di autoradiografia recettoriale per l'individuazione anatomica dei CB1 sono stati effettuati utilizzando il protocollo sperimentale descritto precedentemente da Castelli et al (2007).

Le sezioni adiacenti a quelle che sono state utilizzate per gli esperimenti di autoradiografia sono state selezionate e colorate con la metodica del rosso neutro affinché fosse certa l'identificazione delle aree cerebrali di nostro interesse.

Le sezioni sono state incubate a 37°C per 2.5 ore in tampone 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) contenente 5% siero di albumina bovina (BSA) e 10 nM di [³H]CP55940 (attività specifica: 124 Ci/mmol; Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Il binding non specifico è stato determinato in sezioni cerebrali adiacenti in presenza di CP55940 non marcato alla concentrazione di 10 μM. Al termine dell'incubazione, le sezioni sono state lavate per due volte consecutive in tampone Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) con 1% BSA ed una volta (5 min) in 50 mM Tris-HCl a 4 °C. Infine, l'ultimo lavaggio è stato effettuato in acqua milliQ a 4 °C e le sezioni sono state fatte asciugare all'aria rivolgendo loro un particolare attenzione.

Analisi delle immagini

Una volta che le sezioni di tessuto sono completamente asciutte, sono state posizionate insieme agli standard [³H]micro-scales (RPA 501 and 505, Amersham) per il [³H](-)-CP55940 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 [³H]. I risultati sono stati espressi come percentuale dell'attività basale.

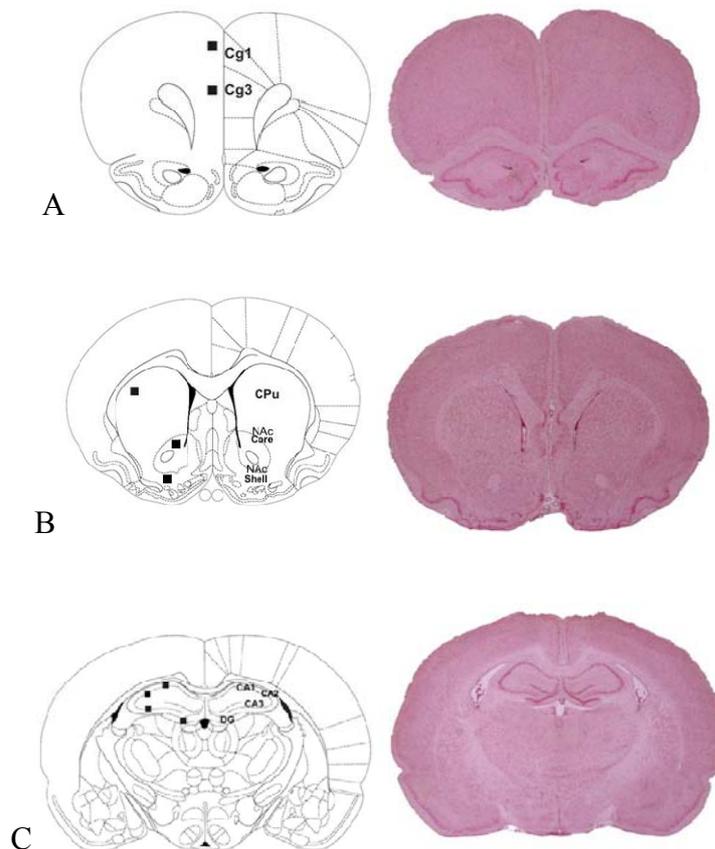


Fig.11: Rappresentazione grafica e schematica delle aree cerebrali studiate, secondo con l'Atlante Paxinos e Watson : la corteccia prefrontale (corteccia cingolata 1 e corteccia cingolata 3, Cg1 e Cg3) (A); caudato putamen (CPu), core del nucleo accumbens (NAcc Core) e shell del nucleo accumbens (NAcc shell) (B); Formazioni ippocampali del corno d'Ammonio uno (CA1), due (CA2) tre (CA3) e giro dentato (DG) o, amigdala (AMY), ipotalamo laterale (LM) e ventromediale (VMH) (C). I quadrati neri indicano approssimativamente la localizzazione dell'area analizzata per l'autoradiografia recettoriale.

Analisi statistica

La significatività statistica dei dati è stata determinata con l'Analisi della Varianza (ANOVA) ad una , due e tre vie seguita dai test di Newman-Keuls o Bonferroni per una comparazione post-hoc.

Sono state considerate significative le differenze con $p < 0.05$

RISULTATI

Induzione del comportamento di binge eating

Come già precedentemente dimostrato in letteratura (Corwin et al., 1998; Dimitriou et al., 2000), i risultati relativi alla fase di induzione del comportamento del binge eating evidenziano che gli animali del gruppo a regime di accesso limitato ed intermittente alla margarina (High restriction o HR) per un periodo di 2h, sviluppano un comportamento di compulsività (binge eating) che si traduce in un più alto consumo di margarina rispetto al gruppo Low restriction (LR) che ha accesso alla margarina, sempre per 2h, ma tutti i giorni della settimana (Fig.12). L'ANOVA a due vie rivela un significativo effetto dell'interazione delle due variabili gruppo x tempo [$F_{(3,114)} = 6.16$, $P = 0.0006$]. L'analisi *post hoc* mostra che il consumo di margarina è significativamente superiore nel gruppo HR rispetto a quello LR, comportamento che si evidenzia già dalla seconda settimana di sperimentazione e diventa significativamente superiore nelle settimane successive ($^{\$}P < 0.001$ nella 2^a, 3^a e 4^a settimana). Per quanto riguarda il consumo di cibo standard nelle 2h di accesso limitato, l'ANOVA a due vie mostra un effetto significativo del gruppo [$F_{(2,171)} = 16.37$, $P < 0.0001$] e del tempo [$F_{(3,171)} = 3.89$, $P = 0.0101$]. Dalla Fig. 12 si può osservare che sia il gruppo HR che il gruppo LR hanno un consumo di cibo standard significativamente inferiore rispetto a quello del gruppo di controllo (C), che non ha mai accesso alla margarina, durante tutta la fase di induzione del comportamento di binge ($^{\#}P < 0.01$; $^*P < 0.05$ vs C). Considerando il consumo totale di cibo (margarina + cibo standard) nelle 2h di accesso limitato, il gruppo HR ha un introito calorico significativamente più elevato rispetto al gruppo di controllo C e al gruppo LR [ANOVA a due vie, effetto dell'interazione gruppo x tempo $F_{(6,171)} = 4.04$, $P = 0.0008$](Fig. 9C). L'analisi *post hoc* mostra che tale comportamento rispetto al gruppo LR si evidenzia già dalla seconda settimana di sperimentazione ($^{\$}P < 0.0012^a$, 3^a e 4^a settimana). In entrambi i gruppi HR ed LR, il consumo di cibo totale durante l'accesso limitato alla margarina è decisamente superiore al gruppo di controllo C ($^{\$}P < 0.001$ 1^a, 2^a, 3^a e 4^a settimana).

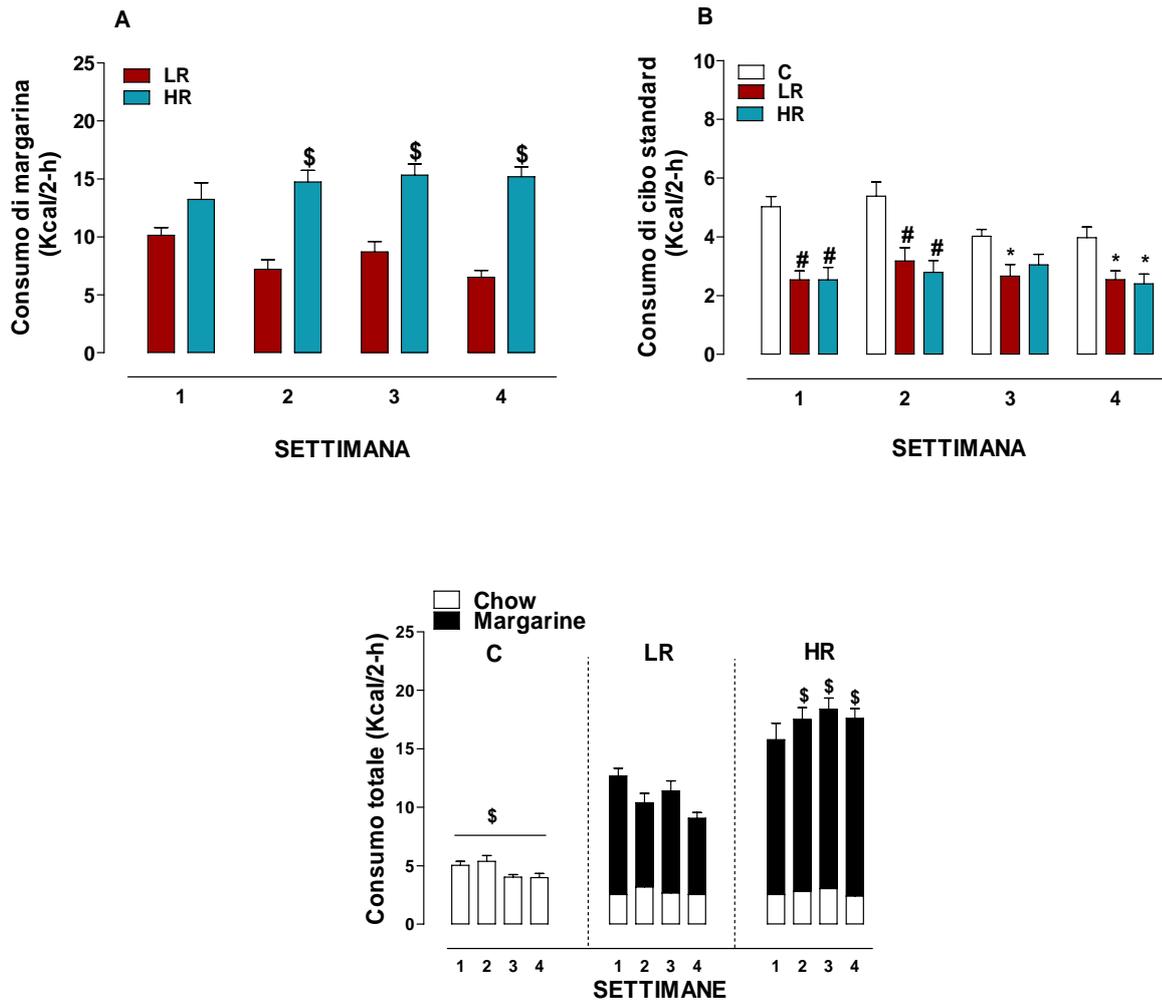


Fig.12 : I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le due ore di sperimentazione.

STUDI COMPORTAMENTALI

Valutazione dell'attività motoria

La Fig.13 raffigura l'analisi dell'attività motoria basale delle ratte durante la fase di pre-binge, cioè un'ora e mezza prima che gli animali abbiano accesso alla margarina. Considerando la distanza percorsa, sia quella della curva temporale (raccolta ad intervalli di 10 minuti per un periodo complessivo di 60 minuti) che quella cumulativa, espresse entrambe in cm percorsi durante il test, l'analisi statistica non rivela nessuna modificazione significativa nei tre gruppi sperimentali. Nello specifico, per quanto riguarda la curva temporale, l'ANOVA a due vie evidenzia un effetto significativo solo del tempo [$F_{(5,105)}= 131.57 P <0.0001$], ma non del gruppo [$F_{(2,105)}= 0.99 P = 0.3867$] e nemmeno dell'interazione di queste due variabili [$F_{(10,105)}= 1.54 P = 0.1355$]. Inoltre, dall'analisi della curva temporale è possibile notare che tutti i gruppi tendono a diminuire la propria motilità durante il periodo d'osservazione per un naturale processo di abituamento all'ambiente che li circonda. Anche per quanto riguarda la curva cumulativa, l'ANOVA ad una via non evidenzia nessuna differenza significativa tra i tre gruppi sperimentali [$F_{(2,21)}=0.99 P = 0.3868$] (Fig. 13).

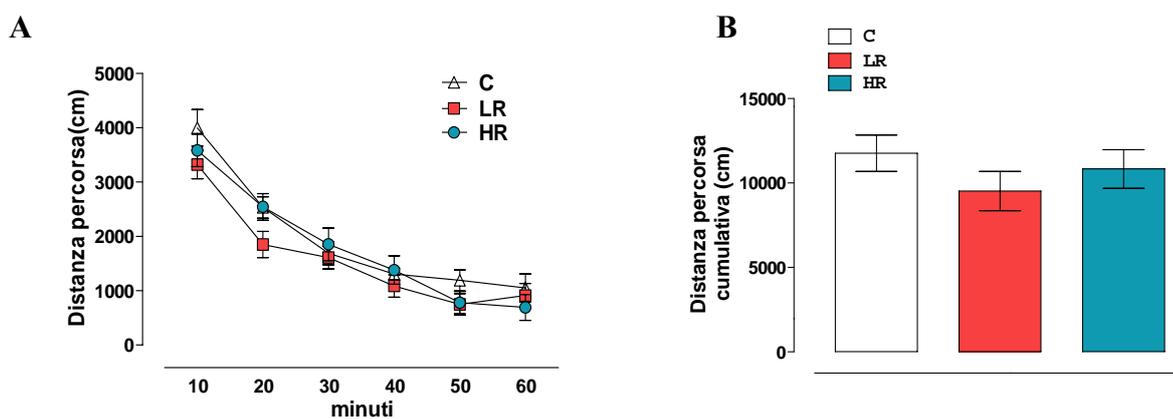


Fig. 13: Attività motoria espressa come distanza percorsa (media \pm sem) espressa in cm durante la fase di pre-binge

Per quanto riguarda il tempo trascorso al centro della gabbia sperimentale (Fig. 14), nessuna differenza significativa è stata rilevata tra i gruppi sperimentali. Anche in questo caso, in riferimento alla curva temporale, l'ANOVA a due vie evidenzia una modificazione statisticamente

significativa nel tempo [$F_{(5,105)} = 26,39$ $P < 0.0001$], ma non nel gruppo [$F_{(2,105)} = 0.17$ $P = 0.8456$] e nell'interazione delle due variabili [$F_{(10,105)} = 0.73$ $P = 0.6959$]. L'analisi dell'ANOVA ad una via del tempo totale trascorso al centro della gabbia conferma che non c'è alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi sperimentali [$F_{(2,21)} = 0.1675$ $P = 0.8456$].

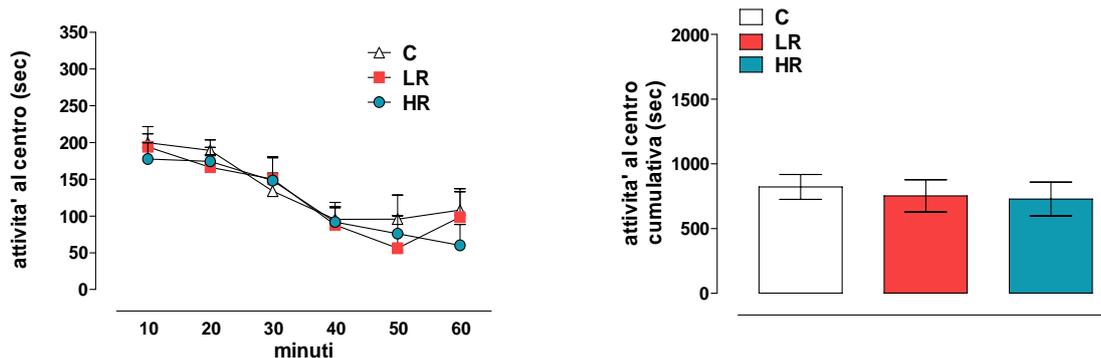


Fig. 14: attività al centro della gabbia sperimentale durante la fase di pre-binge

Anche nella fase di post-binge, nella quale l'attività motoria è stata valutata mezz'ora dopo l'accesso alla margarina, l'analisi statistica della curva temporale effettuata mediante l'ANOVA a due vie, non rileva alcuna modificazione significativa tra i tre gruppi sperimentali sia in termini di distanza percorsa che di tempo trascorso al centro della gabbia (Distanza percorsa: gruppo $F_{(2,85)} = 1.58$ $P = 0.2357$; tempo $F_{(5,85)} = 129.83$ $P < 0.0001$; interazione $F_{(10,85)} = 0.73$ $P = 0.6985$; tempo trascorso al centro: gruppo $F_{(2,85)} = 0.35$ $P = 0.7102$; tempo $F_{(5,85)} = 1.84$ $P = 0.1146$; interazione $F_{(10,85)} = 0.66$ $P = 0.7597$) (Fig.15 e 16). Per quanto riguarda sia la distanza totale percorsa che il tempo totale trascorso al centro della gabbia, l'ANOVA ad una via, anche in questo caso, non evidenzia nessuna differenza significativa tra i gruppi sperimentali (Distanza percorsa: $F_{(2,17)} = 0.4631$, $P = 0.6370$; tempo trascorso al centro: $F_{(2,17)} = 0.1992$ $P = 0.8213$).

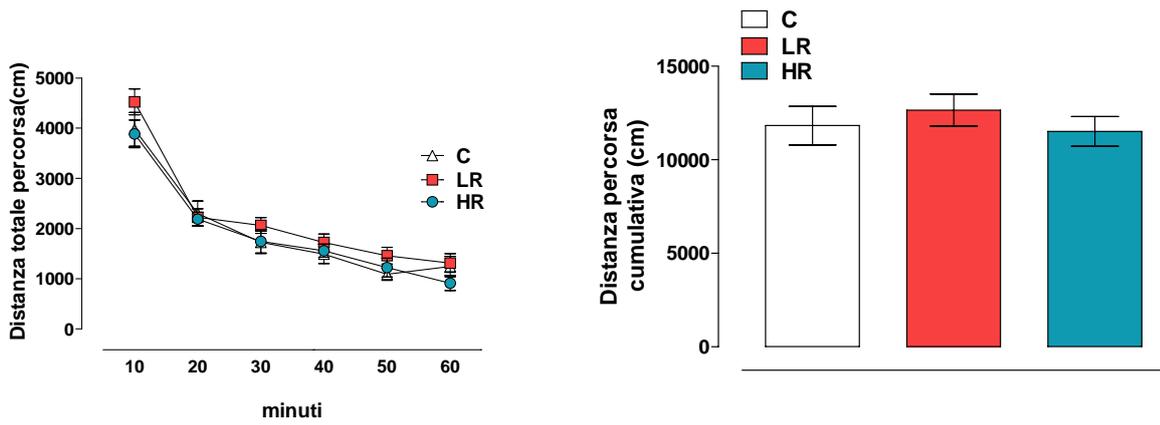


Fig. 15: Attività motoria espressa come distanza percorsa (media \pm sem) in cm durante la fase di post-binge

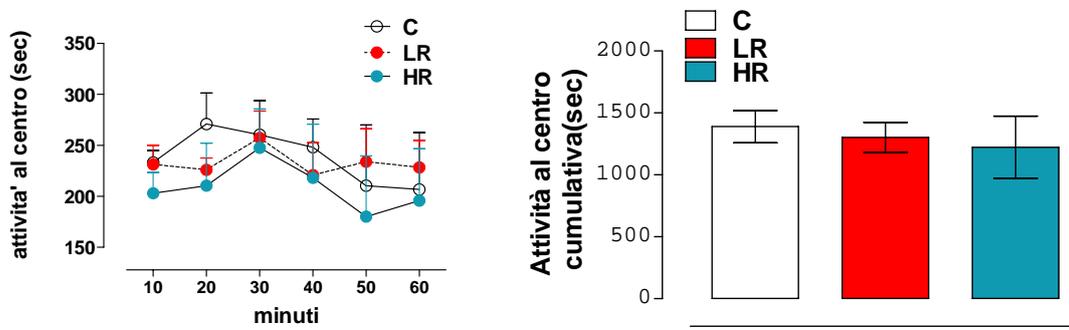


Fig. 16: Attività al centro della gabbia sperimentale durante la fase di post-binge

Valutazione del comportamento simil-depressivo mediante il test del nuoto forzato

Il comportamento dei tre gruppi sperimentali nel test del nuoto forzato è mostrato in Figura 17. Il test del nuoto forzato non ha evidenziato nessuna differenza significativa negli animali mostranti il comportamento di binge eating (HR) rispetto a quelli LR ed a quelli di controllo (C). Infatti, l'ANOVA ad una via non mostra nessuna differenza significativa in nessuno dei tre parametri presi in considerazione durante i 5 minuti totali del test: *immobilità* [$F_{(2,15)} = 0.6105$ P = 0.5561]; *swimming* [$F_{(2,15)} = 0.7185$ P = 0.5035]; *climbing* [$F_{(2,15)} = 1.452$ P = 0.2651).

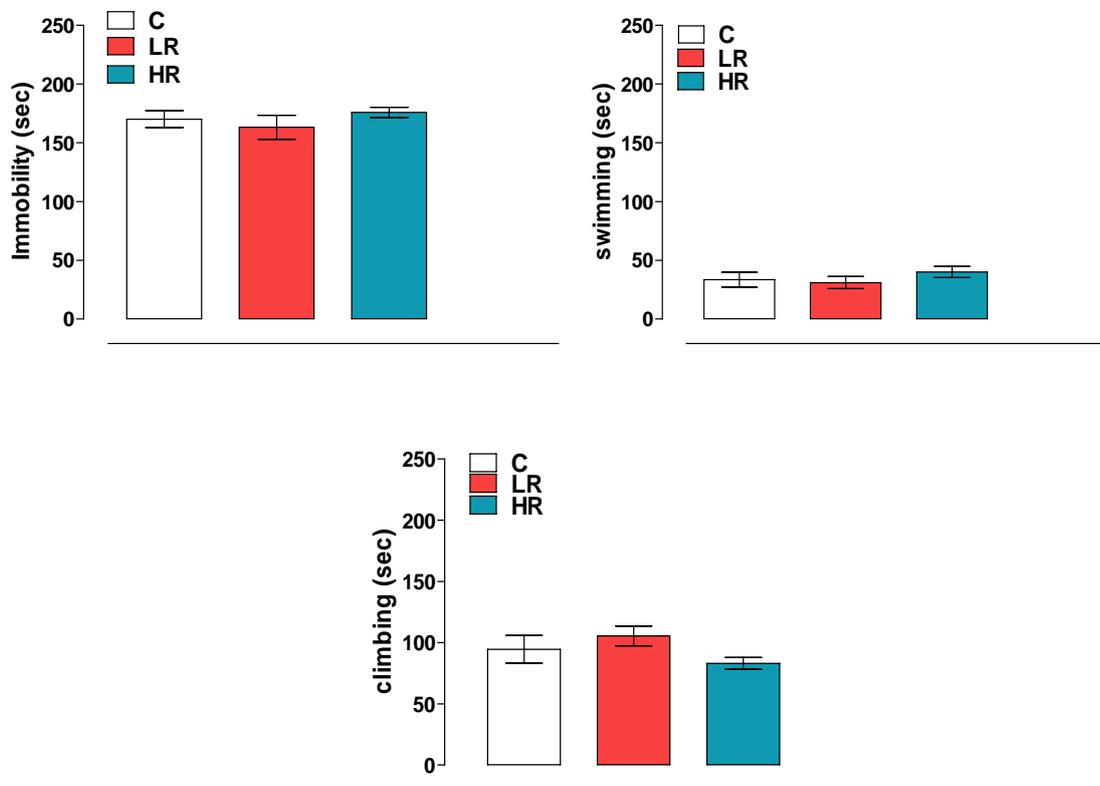


Fig.17: I dati sono espressi come media \pm sem della durata dell'immobility, dello swimming e climbing nella fase di pre-binge

Anche nella fase di post-binge, il test del nuoto forzato non ha evidenziato nessuna differenza significativa tra i tre gruppi sperimentali, come mostrato in figura 18. L'analisi statistica non rivela nessuna differenza significativa nel parametro *immobility* [$F_{(2,14)} = 1.905$ P = 0.1855], nè del tempo

di *swimming* [$F_{(2,14)} = 0.9306$ $P = 0.4174$] tanto meno nel *climbing* [$F_{(2,14)} = 0.4487$ $P = 0.6474$] durante i 5 minuti totali del test (Fig.18).

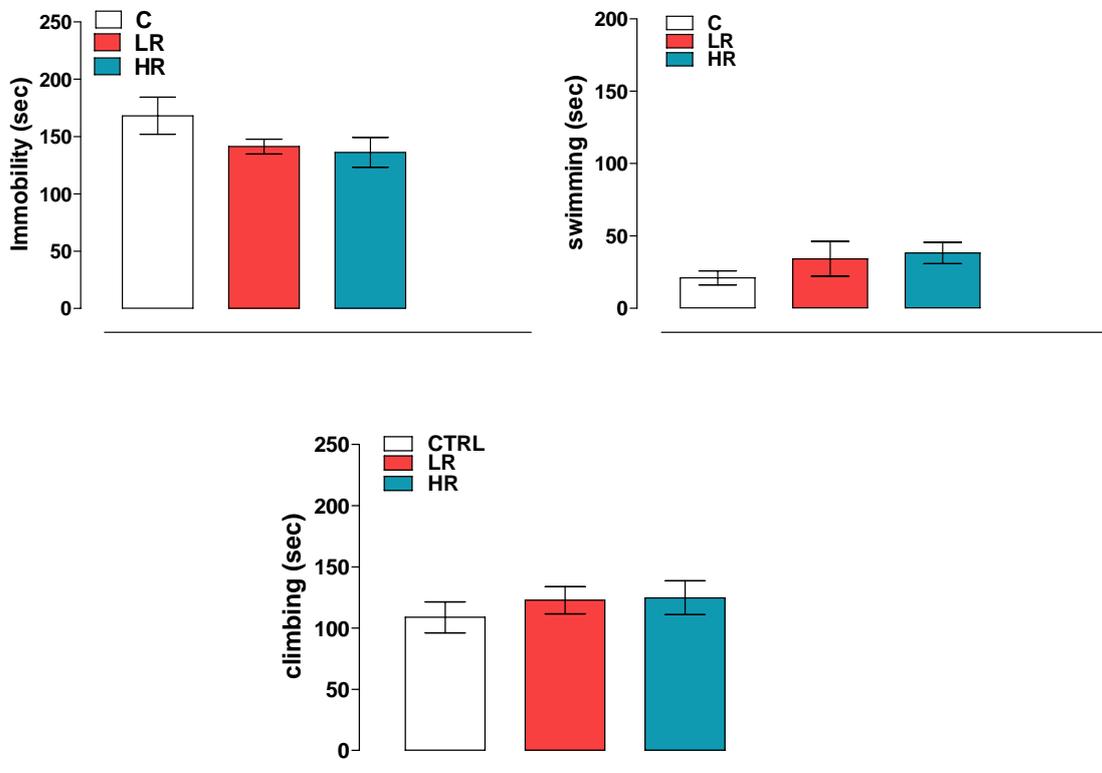


Fig.18: I dati sono espressi come media \pm sem della durata dell'immobilty, dello swimming e climbing

Valutazione del comportamento ansioso mediante il test comportamentale di ansia “elevated plus maze”

Per valutare lo stato d'ansia degli animali è stato utilizzato il test dell'elevated plus-maze a cui gli animali sono stati sottoposti prima e dopo l'accesso alla margarina (fase di pre e post-binge rispettivamente). Dalla figura 19 è possibile notare che, nella fase di pre-binge, negli animali LR sia la percentuale di tempo che gli animali spendono nei bracci aperti sia la percentuale di entrate negli stessi bracci, è significativamente maggiore rispetto agli animali HR e al gruppo di controllo C, indicando un minore stato d'ansia [% tempo bracci aperti: $F_{(2,19)} = 5.397$, $P = 0.0139$; % entrate

bracci aperti: $F_{(2,19)} = 5.649$, $P = 0.0119$]. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i gruppi sperimentali per quanto riguarda il numero di entrate nei bracci chiusi. Nella fase di post-binge (Fig. 20), la percentuale di tempo che gli animali LR spendono nei bracci aperti è significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo C [$F_{(2,19)} = 5.378$, $P = 0.0141$]; nessuna differenza significativa è stata invece rilevata nella percentuale di entrate negli stessi bracci [$F_{(2,19)} = 5.649$, $P = 0.0119$]. Nessuna differenza significativa è stata rilevata tra il gruppo LR e gli animali HR. È importante sottolineare che all'interno del gruppo HR, tra la fase di pre-binge e quella di post-binge esiste una differenza significativa sia nella percentuale di tempo che gli animali spendono nei bracci aperti sia nella percentuale di entrate negli stessi bracci, indicando un minore stato d'ansia degli animali dopo l'accesso alla margarina [% tempo bracci aperti: $t_{(12)} = 3.618$, $P = 0.0035$; % entrate bracci aperti: $t_{(12)} = 2.940$, $P = 0.0124$].

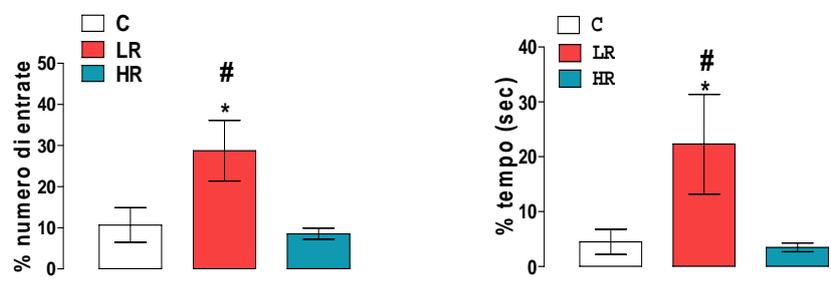


Fig. 19: I dati sono espressi come percentuale di entrate nei bracci aperti e percentuale tempo trascorso negli stessi bracci e numero di entrate nei bracci chiusi nella fase di pre-binge. Gli istogrammi rappresentano le medie \pm sem. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA ad una via seguita dal test Newman-Keuls: * $p < 0.05$ rispetto al gruppo C; # $p < 0.01$ rispetto al gruppo LR.

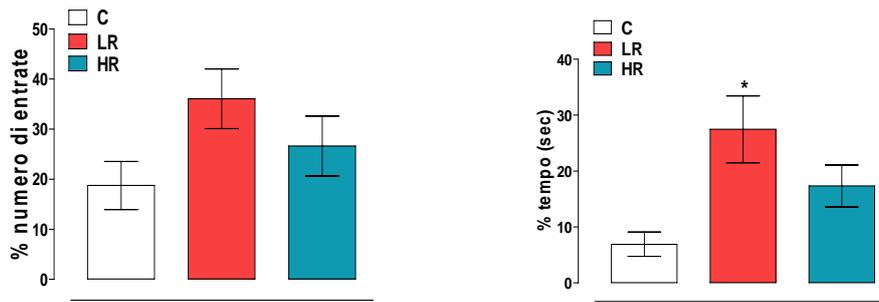


Fig. 20: I dati sono espressi come percentuale di entrate nei bracci aperti e percentuale tempo trascorso negli stessi bracci e numero di entrate nei bracci chiusi nella fase di post-binge. Gli istogrammi rappresentano le medie \pm S.E.M. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA ad una via seguita dal test Newman-Keuls: * $p < 0.05$ rispetto al gruppo C;

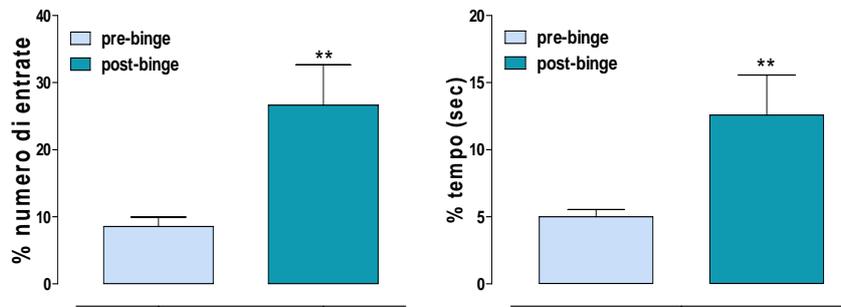


Fig. 21 I dati sono espressi come percentuale di entrate nei bracci aperti e percentuale tempo trascorso negli stessi bracci e numero di entrate nei bracci chiusi nella fase di pre e post-binge. Gli istogrammi rappresentano le medie \pm S.E.M. Le analisi statistiche sono state eseguite con il metodo ANOVA seguite dal test di Bonferroni: * $p < 0.05$ rispetto al gruppo C; # $p < 0.01$ rispetto al gruppo LR.

STUDI FARMACOLOGICI

Effetto in acuto dell'agonista CB1/CB2 WIN 55,212 sul comportamento di binge eating

La somministrazione del WIN 55,212-2, ad entrambe le dosi testate (1 e 2 mg/kg), determina la modificazione statisticamente significativa del consumo di margarina solo nel gruppo LR durante le 2h di accesso limitato al cibo palatabile (Fig.22) (ANOVA ad una via gruppo LR: $F_{(2,20)} = 4.878$, $P = 0.0181$; $*p < 0.05$). Considerando il consumo di cibo standard, il WIN 55,212 determina un aumento significativo solamente nel gruppo degli animali HR ad entrambe le dosi testate rispetto ai veicoli (ANOVA ad una via gruppo HR: $F_{(2,21)} = 9.373$, $P = 0.0012$; $**p < 0.01$ HR Veh vs HR 1 mg/Kg; $**p < 0.01$ HR Veh vs HR 2 mg/Kg). Il trattamento con il WIN 55,212 modifica il consumo totale di cibo durante le 2h di accesso limitato soltanto nel gruppo LR (ANOVA ad una via gruppo LR: $F_{(2,20)} = 4.176$, $P = 0.0305$; $*p < 0.05$).

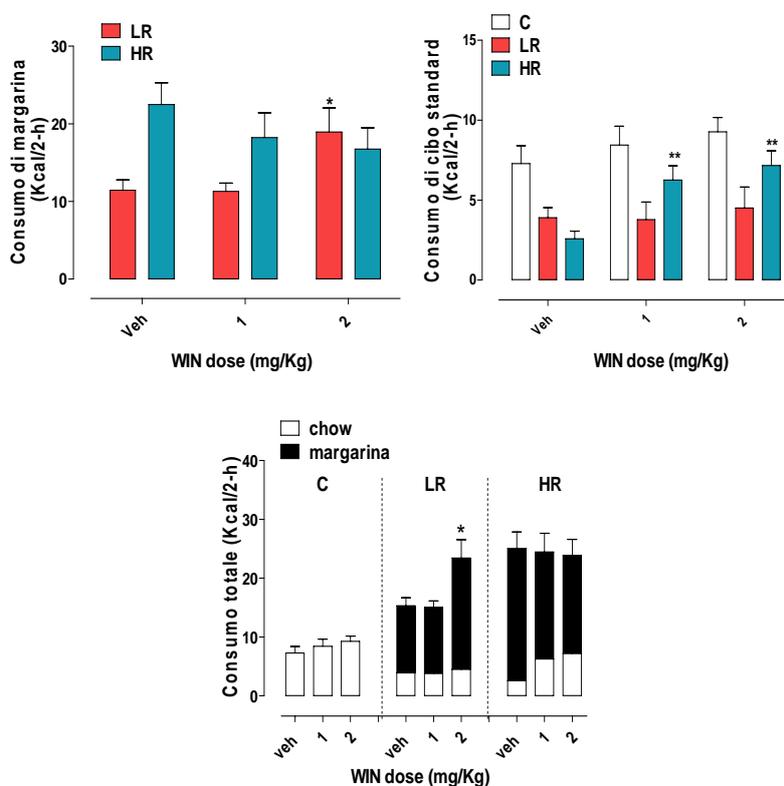
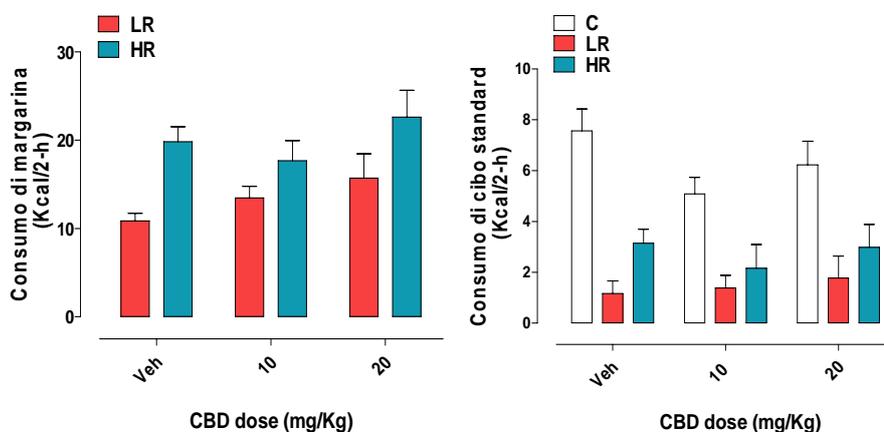


Fig. 22: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le due ore di sperimentazione. L'analisi statistica è stata eseguita con il metodo ANOVA seguite dal test di Newman-Keules. Gruppo LR: $*p < 0.05$ rispetto a veh.

Effetto in acuto del cannabinoide naturale non psicoattivo cannabidiolo (CBD) sul comportamento di binge eating

La somministrazione del CBD ad entrambe le dosi testate (10 e 20 mg/kg), non determina alcuna modificazione statisticamente significativa del consumo di margarina sia nel gruppo LR che nel gruppo HR (Fig. 23). L'ANOVA a due vie evidenzia un effetto significativo del gruppo [$F_{(1,28)}=11.39, P=0.0045$], ma non del trattamento [$F_{(2,28)}=2.35, P=0.1138$] e tanto meno dell'interazione fra queste due variabili [$F_{(2,28)}=0.74, P=0.4882$]. L'ANOVA ad una via, effettuata all'interno di ciascun gruppo, conferma che non c'è alcuna modificazione del consumo del cibo palatabile in seguito alla somministrazione del farmaco (gruppo LR: $F_{(2,21)}=1.756, P=0.1972$; gruppo HR: $F_{(2,21)}=1.066, P=0.3622$). Per quanto riguarda il consumo di cibo standard, il CBD non determina nessuna modificazione in nessuno dei tre gruppi sperimentali presi in considerazione rispetto agli animali trattati con il solo veicolo. Infatti l'ANOVA ad una via, effettuata all'interno di ciascun gruppo, non mostra significative differenze tra il gruppo trattato con il farmaco ed i corrispondenti veicoli durante l'episodio di binge eating [gruppo C: $F_{(2,21)}=2.295, P=0.1255$; gruppo LR: $F_{(2,21)}=0.2702, P=0.7659$; gruppo HR: $F_{(2,21)}=0.4257, P=0.6588$]. In accordo, il trattamento con il CBD non modifica il consumo totale di cibo durante le due ore di accesso limitato in nessuno dei tre gruppi sperimentali.



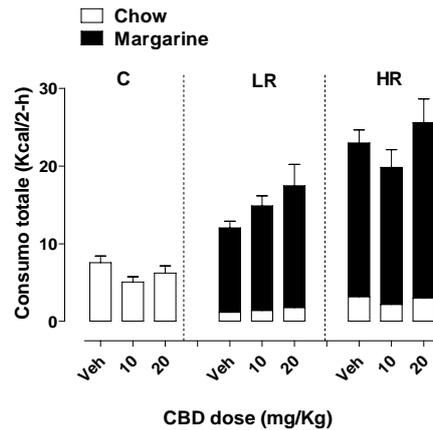


Fig. 23: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le due ore di sperimentazione.

Effetto in acuto dell'inibitore selettivo dell'enzima monoaminoglicerolipasi (MAGL) JZL 184 sul comportamento di binge eating

La somministrazione acuta di JZL184 alle dosi di 2 e 4 mg/kg non determina alcuna modificazione significativa del consumo di margarina nel gruppo HR (ANOVA ad una via, $F_{2,21} = 0.367$ $P = ns$) (Fig. 24). Al contrario, la somministrazione del farmaco induce un aumento significativo del consumo di margarina nel gruppo LR ad entrambe le dosi testate (ANOVA ad una via, $F_{2,21} = 4.415$ $P = 0.0250$; analisi *post hoc* $P < 0.005$ vs Veh). Per quanto riguarda il consumo di cibo standard entrambe le dosi testate non determinano alcuna modificazione significativa in nessuno dei tre gruppi sperimentali. In linea con i risultati dei singoli cibi, il consumo del cibo totale viene aumentato significativamente solo nel gruppo LR (ANOVA ad una via, $F_{2,21} = 5.133$, $P = 0.0153$; analisi *post hoc* $P < 0.05$ vs Veh)(Fig. 24).

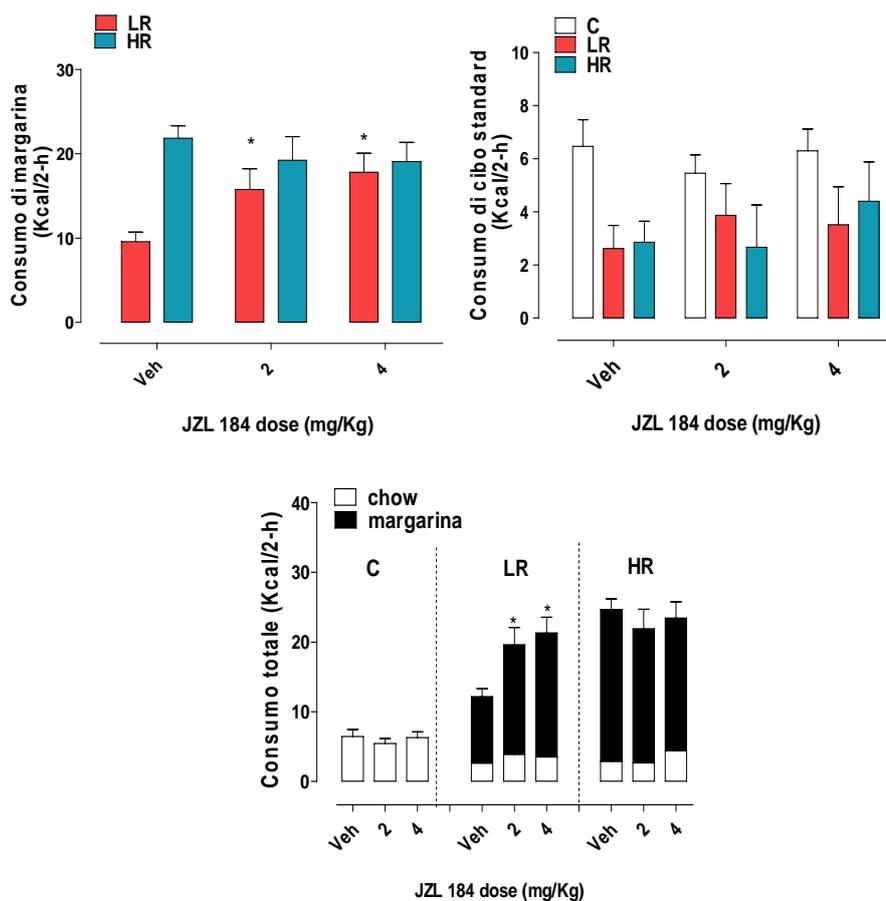


Fig. 24: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le due ore di sperimentazione. L'analisi statistica è stata eseguita con il metodo ANOVA seguita dal test di Newman-Keules. Gruppo LR: * $p < 0.05$ rispetto a veh.

Effetto dell'AM630, antagonista CB₂, sul comportamento di binge eating

La somministrazione dell'AM630, antagonista selettivo del recettore CB₂, ad entrambe le dosi testate (2.5 e 5 mg/kg), non determina alcuna modificazione statisticamente significativa del consumo di margarina sia nel gruppo LR che nel gruppo HR durante le 2h di accesso limitato al cibo palatabile. L'ANOVA a due vie evidenzia un effetto significativo del gruppo [$F_{(1,24)} = 20.09$, $P = 0.0007$], ma non del trattamento [$F_{(2,24)} = 0.36$, $P = 0.7045$] e tanto meno dell'interazione fra queste due variabili [$F_{(2,24)} = 0.33$, $P = 0.7243$]. Per quanto riguarda il consumo di cibo standard non si evidenzia nessuna modificazione significativa fra i tre gruppi sperimentali considerati. Infatti l'ANOVA ad una via, effettuata all'interno di ciascun gruppo, non mostra significative differenze

tra il gruppo trattato con il farmaco ed i corrispondenti veicoli durante l'episodio di binge eating [gruppo C: $F_{(2,21)} = 2.143$, $P = 0.1542$; gruppo LR: $F_{(2,21)} = 1.611$, $P = 0.2345$; gruppo HR: $F_{(2,21)} = 0.4031$, $P = 0.6758$] (Fig. 25). In accordo, il trattamento con il farmaco non modifica il consumo totale di cibo in nessuno dei tre gruppi sperimentali.

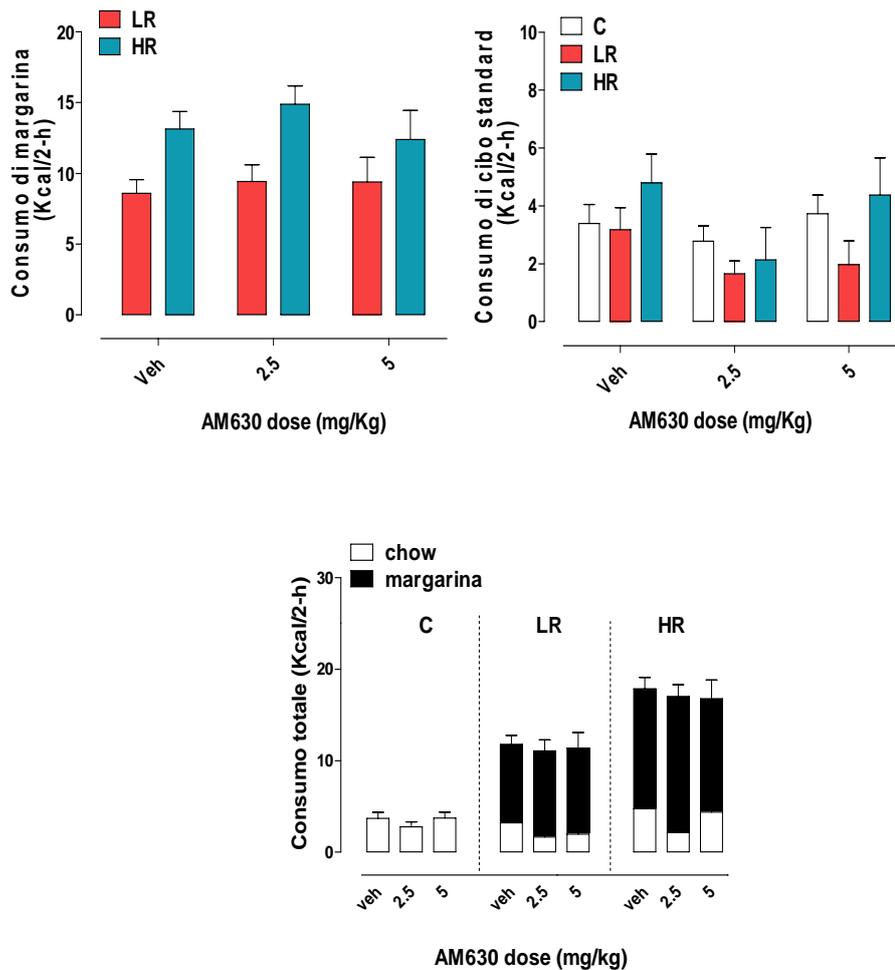


Fig. 25: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le due ore di sperimentazione.

Effetto del trattamento cronico con l' antagonista/agonista inverso CB1 Rimonabant sul comportamento di binge eating

La figura 26 mostra l'effetto della somministrazione cronica (tre settimane) di rimonabant alla dose di 0.3 mg/Kg e del suo corrispondente veicolo, sul consumo di margarina e di cibo standard durante le 2h di accesso limitato al cibo palatabile. L'ANOVA a tre vie mostra un effetto significativo del gruppo [$F_{(1,36)} = 71.630$, $P < 0.0001$], del trattamento [$F_{(1,36)} = 71.630$, $P < 0.0001$], ma non del tempo [$F_{(2,36)} = 0.7592$, $P = 0.4713$], ed inoltre non è stata evidenziata nessuna interazione significativa tra le tre variabili. L'ANOVA a due vie, utilizzata all'interno della variabile gruppo, evidenzia un effetto significativo del trattamento [LR: $F_{(1,36)} = 18.50$, $P = 0.0004$; HR: $F_{(1,36)} = 21.75$, $P = 0.0002$]. Entrambi i gruppi LR e HR consumano significativamente meno margarina rispetto ai loro veicoli durante le tre settimane di trattamento [Student's t-test: LR 1^a settimana: $t_{(18)} = 4.518$, $P = 0.0003$; 2^a settimana: $t_{(18)} = 4.816$, $P = 0.0001$; 3^a settimana: $t_{(18)} = 2.622$, $P = 0.0173$; HR 1^a settimana: $t_{(18)} = 3.775$, $P = 0.0014$; 2^a settimana: $t_{(18)} = 4.009$, $P = 0.0007$; 3^a settimana: $t_{(18)} = 3.256$, $P = 0.0044$]. Per quanto riguarda il consumo di chow durante le 2h di accesso contemporaneo alla margarina, l'ANOVA a tre vie evidenzia un effetto significativo solo nella variabile trattamento [$F_{(1,54)} = 5.1504$, $P = 0.027$], ma nessuna significatività è stata riscontrata nella variabile gruppo [$F_{(2,54)} = 2.5399$, $P = 0.088$], in quella tempo [$F_{(2,54)} = 1.613$, $P = 0.203$] e nell'interazione delle tre. L'ANOVA a due vie, effettuata all'interno di ciascun gruppo, mostra un effetto significativo del trattamento solamente nel gruppo C [$F_{(1,36)} = 11.66$, $P = 0.0031$] evidenziando che il rimonabant porta gli animali a consumare significativamente meno chow rispetto ai propri veicoli durante le prime due settimane di trattamento [Student's t-test: 1^a settimana: $t_{(18)} = 2.716$, $P = 0.0142$; 2^a settimana: $t_{(18)} = 3.369$, $P = 0.0034$], ma non nell'ultima (3^a settimana). Infine, il rimonabant riduce il consumo totale di cibo (consumo di margarina + consumo di cibo standard per il gruppo degli LR e degli HR, mentre il solo cibo standard per il gruppo di controllo C) in tutti e tre i gruppi; l'ANOVA a due vie utilizzata all'interno di ogni gruppo evidenzia un

effetto principale del trattamento [gruppo C: $F_{(1,36)} = 11.66$, $P = 0.0031$; gruppo LR: $F_{(1,36)} = 20.97$, $P = 0.0002$; gruppo HR: $F_{(1,36)} = 9.78$, $P = 0.0058$]. Il consumo totale di cibo risulta essere inferiore sia negli animali LR che in quelli HR comparati con i rispettivi veicoli durante tutte e tre le settimane di trattamento [Student's t -test: LR 1^a settimana: $t_{(18)} = 5.224$, $P < 0.0001$; 2^a settimana: $t_{(18)} = 4.897$, $P = 0.0001$; 3^a settimana: $t_{(18)} = 2.599$, $P = 0.0181$; HR 1^a settimana: $t_{(18)} = 2.826$, $P = 0.0112$; 2^a settimana: $t_{(18)} = 3.247$, $P = 0.0045$; 3^a settimana: $t_{(18)} = 2.748$, $P = 0.0132$]. Come menzionato poc'anzi, il rimonabant è in grado di ridurre il consumo totale di cibo degli animali appartenenti al gruppo C solo durante le prime due settimane di trattamento.

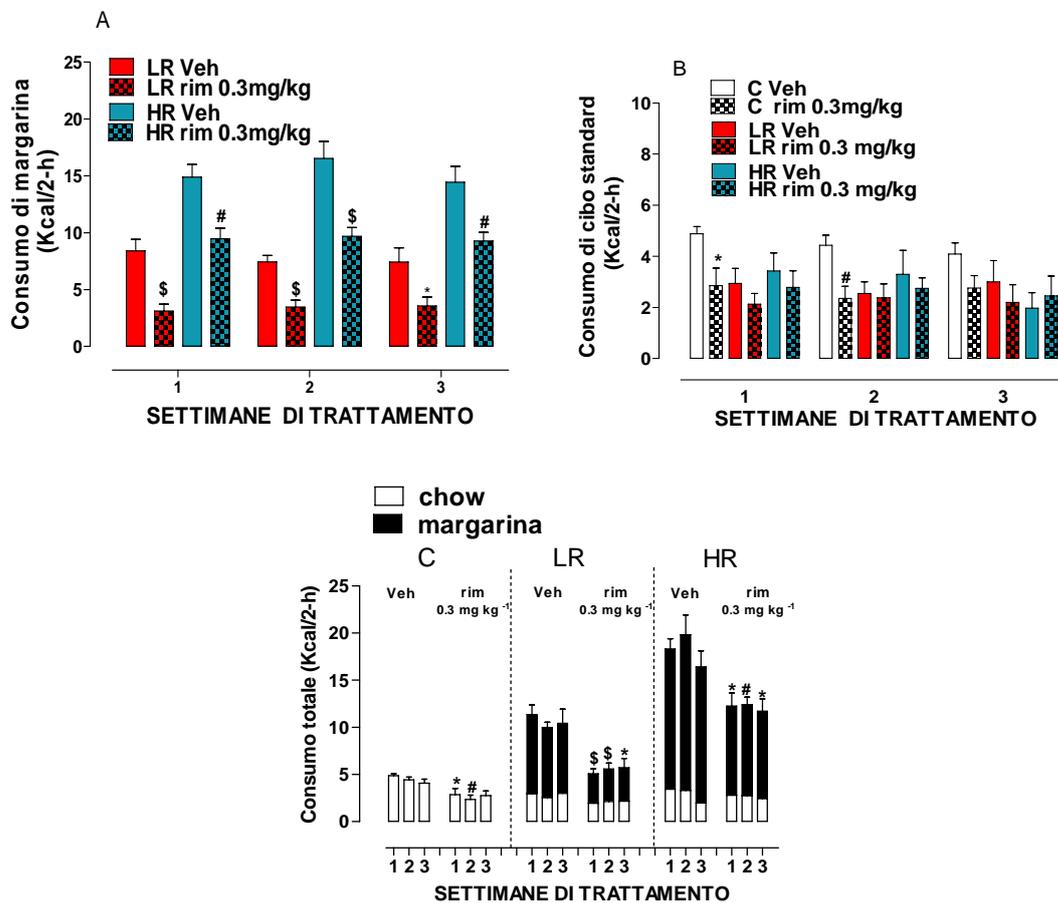


Fig.26 : I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le 2h di sperimentazione. L'analisi statistica è stata eseguita con il metodo ANOVA seguite dal test di Newman-Keules. Gruppo C: * $p < 0.05$ # $p < 0.01$ rispetto al veh; Gruppo LR: * $p < 0.05$ # $p < 0.001$ rispetto al veh; Gruppo HR: * $p < 0.05$ # $p < 0.01$ rispetto al veh.

Effetto del trattamento cronico con l' antagonista/agonista inverso CB₁ Rimonabant sul peso corporeo

Nella fase di induzione si evidenzia una significativa differenza di peso corporeo fra i vari gruppi (Fig. 26A). L'ANOVA a due vie mostra un effetto significativo del gruppo [$F_{(2,171)} = 4.13$, $P = 0.0212$] e del tempo [$F_{(3,171)} = 529.55$, $P < 0.0001$], ed una significativa interazione fra queste due variabili [$F_{(6,171)} = 4.13$, $P = 0.0007$]. L'analisi *post hoc* indica che gli animali HR posseggono un peso corporeo significativamente superiore rispetto a quello del gruppo di controllo C, e questa differenza si evidenzia nella terza e quarta settimana di induzione (3^a settimana: $P < 0.05$; 4^a settimana: $P < 0.01$) (Fig. 27A). Nessuna differenza significativa nel peso è stata riscontrata tra il gruppo HR e LR così come tra il gruppo di controllo C e il gruppo LR.

L'effetto prodotto dalla somministrazione cronica di rimonabant sul peso corporeo e del rispettivo veicolo è mostrata in figura 27B. L'ANOVA a tre vie evidenzia un significativo effetto del gruppo [$F_{(2,54)} = 4.72$, $P = 0.01294$], del trattamento [$F_{(1,54)} = 5.15$, $P = 0.0276$] e del tempo [$F_{(2,54)} = 51.38$, $P < 0.0001$], ma non una significativa interazione fra queste tre variabili. L'ANOVA a due vie, utilizzata all'interno di ciascun gruppo, rivela un effetto principale del trattamento solamente nel gruppo HR [$F_{(1,36)} = 5.58$, $P = 0.0296$]. Il trattamento cronico con rimonabant riduce significativamente il peso corporeo degli animali del gruppo HR rispetto ai veicoli corrispondenti. [Student's *t*-test: 1^a settimana: $t(18) = 2.612$, $P = 0.0176$; 2^a settimana: $t(18) = 2.372$, $P = 0.0290$; 3^a settimana: $t(18) = 2.566$, $P = 0.0194$].

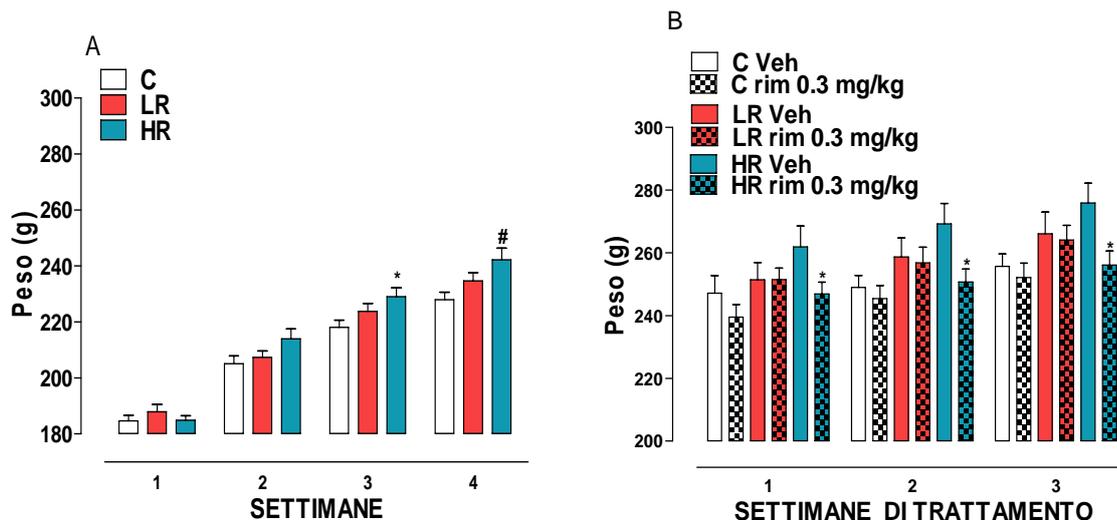


Fig.27 : I dati sono espressi come media \pm sem del peso corporeo espresso in grammi durante la fase di induzione (A) e durante il trattamento cronico con il rimonabant (B). L'analisi statistica è stata eseguita con il metodo ANOVA seguita dal test di Newman-Keules. Gruppo HR: * $p < 0.05$ e # $p < 0.01$ rispetto al gruppo C (A); Gruppo HR: * $p < 0.05$ rispetto al veh (B).

Effetto del trattamento subcronico con l'agonista PPAR α OEA sul comportamento di binge eating

La somministrazione subcronica dell'OEA, agonista endogeno dei recettori PPAR α , ad entrambe le dosi testate (2.5 e 5 mg/kg), non determina alcuna modificazione statisticamente significativa del consumo di margarina sia nel gruppo LR che nel gruppo HR durante le 2h di accesso limitato al cibo palatabile (Fig. 28). L'ANOVA a due vie evidenzia un effetto significativo del gruppo [$F_{(2,28)} = 101.20, P < 0.0001$], ma non del trattamento [$F_{(2,28)} = 0.29, P = 0.7476$] e tanto meno dell'interazione fra queste due variabili [$F_{(2,28)} = 1.00, P = 0.3804$]. Per quanto riguarda il consumo di cibo standard l'analisi statistica evidenzia un effetto significativo solo nella variabile gruppo [$F_{(2,42)} = 12.61, P = 0.0003$] e non in quella trattamento [$F_{(2,42)} = 0.40, P = 0.6723$] o nell'interazione [$F_{(4,42)} = 0.50, P = 0.07366$]. E' evidente però come la dose più alta (5 mg/Kg) testata, mostri un trend di riduzione del consumo di chow solamente nel gruppo degli animali mostrandoti il comportamento di binge eating, nonostante non risulti essere statisticamente significativo. In accordo, il trattamento con il farmaco non modifica il consumo totale di cibo in nessuno dei tre gruppi sperimentali.

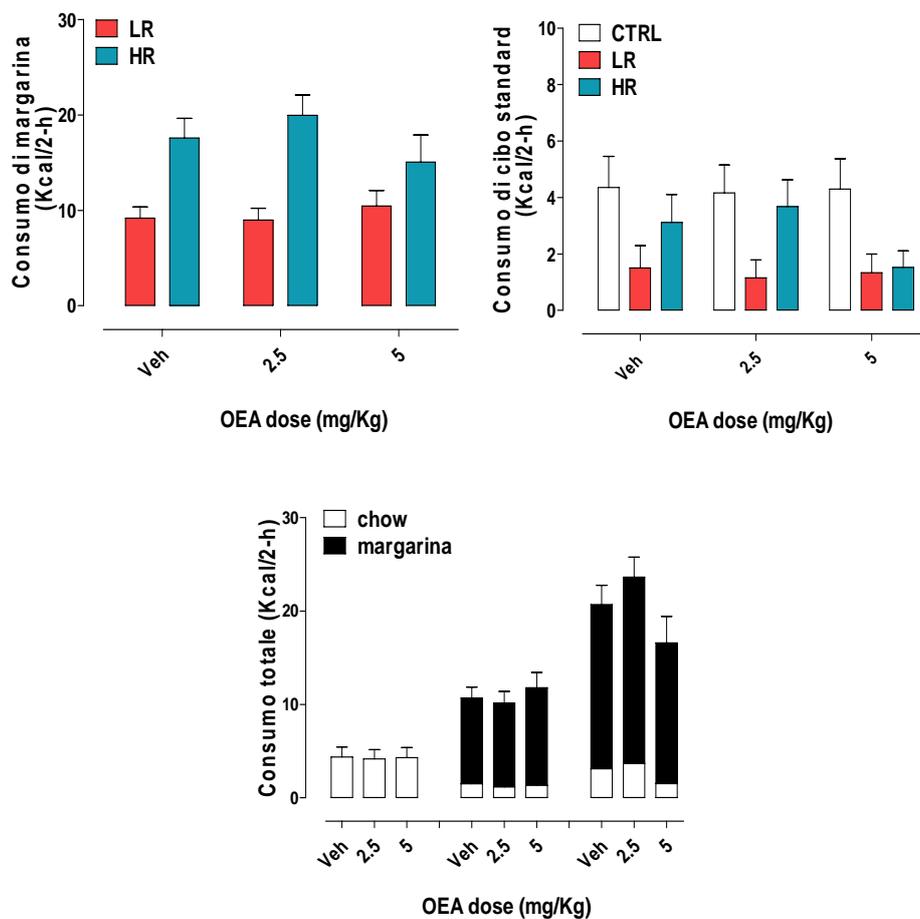


Fig. 28: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le 2h di sperimentazione.

Effetto del trattamento subcronico con l' agonista PPAR α PEA sul comportamento di binge eating

La PEA, agonista endogeno dei recettori PPAR α , non determina alcuna modificazione statisticamente significativa del consumo di margarina sia nel gruppo LR che nel gruppo HR durante le 2h di accesso limitato al cibo palatabile, a nessuna delle due dosi testate (1 e 2 mg/Kg) (Fig.29). L'ANOVA a due vie evidenzia un effetto significativo del gruppo [$F_{(1,28)} = 54.76$, $P < 0.0001$], ma non del trattamento [$F_{(2,28)} = 0.04$, $P = 0.9627$] e tanto meno dell'interazione fra queste due variabili [$F_{(2,28)} = 0.02$, $P = 0.9805$]. Per quanto riguarda il consumo di cibo standard L'ANOVA a due vie evidenzia un effetto significativo solo nella variabile gruppo [$F_{(2,42)} = 3.69$, $P = 0.0424$] e non in quella trattamento [$F_{(2,42)} = 0.13$, $P = 0.8817$] e nell'interazione fra queste due variabili

$[F_{(4,42)} = 0.28, P = 0.8885]$. In accordo, il trattamento con il farmaco non modifica il consumo totale di cibo in nessuno dei tre gruppi sperimentali.

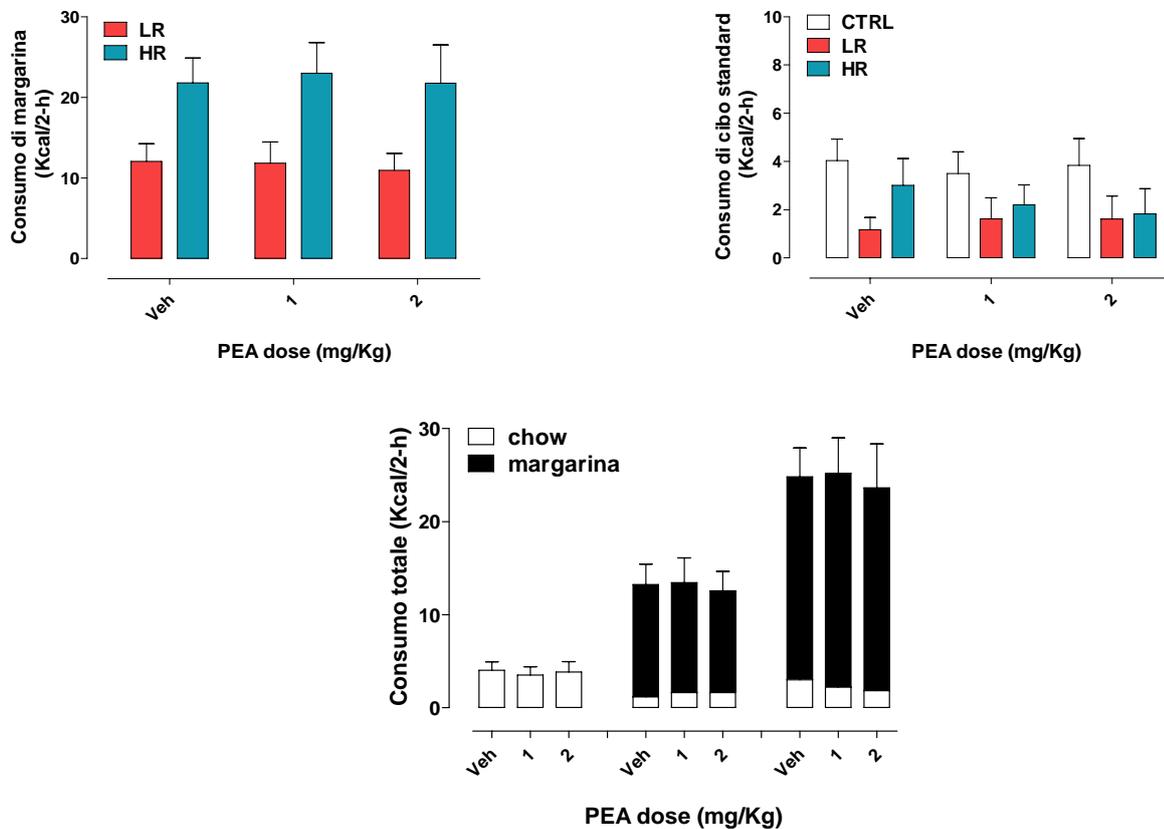


Fig. 29: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le 2h di sperimentazione.

Effetto del trattamento acuto con l'agonista PPAR α clofibrato sul comportamento di binge eating.

La figura 30 mostra l'effetto della somministrazione acuta del clofibrato, agonista sintetico dei recettori PPAR α , sul consumo di margarina e di cibo standard durante le 2h di accesso limitato al cibo palatabile alle dosi di 12.5 e 25 mg/Kg. L'ANOVA a due vie, evidenzia un effetto significativo del gruppo $[F_{(1,24)} = 9.97, P = 0.0083]$, ma non del trattamento $[F_{(2,24)} = 1.11, P = 0.3460]$ e nemmeno nell'interazione tra queste due variabili $[F_{(2,24)} = 0.63, P = 0.5434]$. Per quanto riguarda il consumo di chow durante le 2h di accesso contemporaneo alla margarina, l'ANOVA a due vie non

mostra nessun effetto significativo in nessuna delle variabili considerate: gruppo [$F_{(2,36)} = 2.81, P = 0.0864$], trattamento [$F_{(2,36)} = 0.58, P = 0.5676$] ed interazione [$F_{(4,36)} = 0.89, P = 0.4806$]. In accordo con quanto appena enunciato, il trattamento con il farmaco non modifica il consumo totale di cibo in nessuno dei tre gruppi sperimentali.

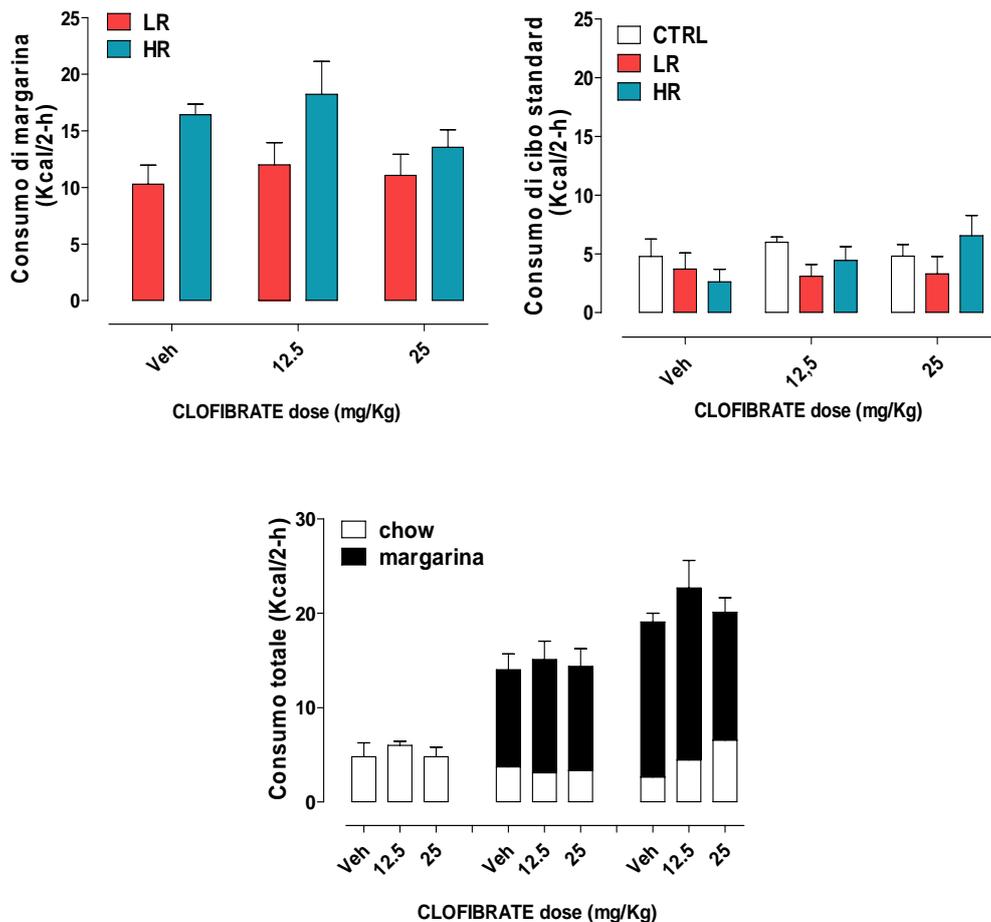


Fig. 30: I dati sono espressi come media \pm sem delle Kcal consumate di margarina e di cibo standard durante le 2h di sperimentazione.

STUDI BIOCHIMICI

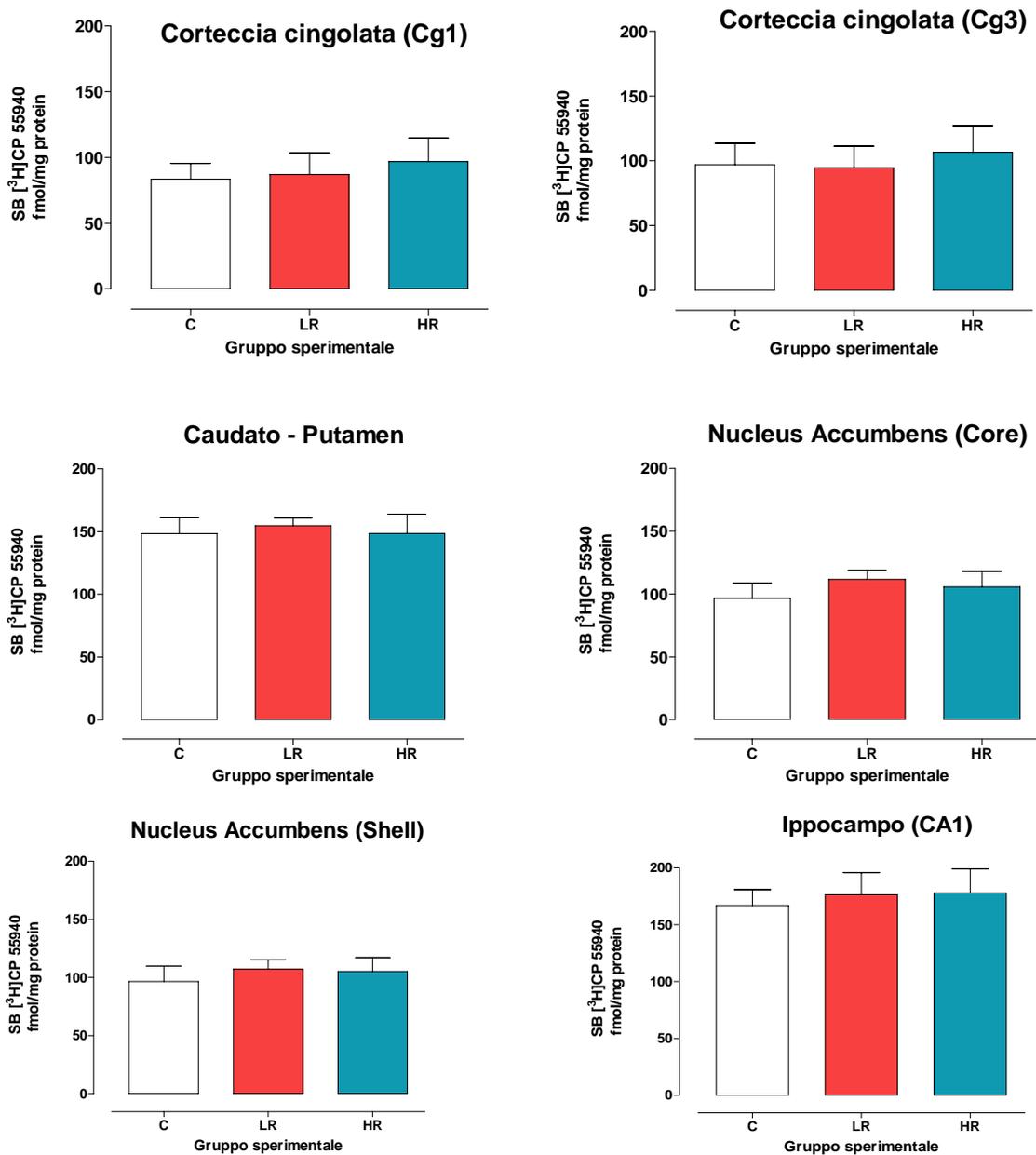
Valutazione della densità del recettore CB₁ in aree cerebrali coinvolte nel comportamento alimentare e nei meccanismi di rinforzo.

La densità del recettore CB₁ è stata valutata in differenti aree cerebrali coinvolte sia nel comportamento alimentare che nei meccanismi di piacere e gratificazione. La tabella sottostante, mostra l'analisi quantitativa degli autoradiogrammi del "binding" specifico del [³H]CP55940 espresso in fmol/mg di proteine nelle diverse aree cerebrali.

AREA CEREBRALE	C Densità recettoriale CB ₁ (fmol/mg prot)	LR Densità recettoriale CB ₁ (fmol/mg prot)	HR Densità recettoriale CB ₁ (fmol/mg prot)
Corteccia Cingolata (Cg1)	83.50 ± 11.99	86,99 ± 16,46	96.74 ± 18.06
Corteccia Cingolata (Cg3)	96.96 ± 16.53	94.59± 16.74	106.7± 20.52
Caudato – Putamen(CPu)	148.5± 12.53	154.6± 6.170	148.6 ± 15.39
Nucleus Accumbens (Core)	96.66 ±11.99	111.6 ± 7.119	105.7 ±12.58
Nucleus Accumbens (Shell)	96.57± 13.29	107.2 ± 7.894	105.2±11.86
Ippocampo (CA1)	167.1± 13.92	176.4± 19.46	178.1±21.07
Ippocampo (CA2)	165 ±19.35	176.9± 21.62	167.6±21.66
Ippocampo (CA3)	155 ±14.33	160.2± 17	159.8 ±21.20
Ippocampo (Giro dentato)	127.9±3.169	144± 17.32	149.3±14.56
Amigdala	86.93± 6.7	102.3± 14.26	92.26±10.69
Ipotalamo laterale (LH)	92.25± 7.2	96.13±7.206	94.01±11.62
Ipotalamo ventro-mediale (VMH)	105.3 ±11.26	107.8±11.42	102.9±17.44

Tab 1 : [³H]CP55940 autoradiografia negli animali del gruppo C, LR e HR

I nostri risultati non rivelano differenze tra il gruppo degli animali di controllo e quelli che sono stati sottoposti ad un accesso continuo alla margarina (LR) così come quelli sottoposti ad un accesso intermittente alla stessa (HR), indicando che la dieta ricca in grassi alla quale questi ultimi due gruppi di animali sono sottoposti non modifica la densità recettoriale CB₁ in nessuna delle aree cerebrali analizzate (Fig.31).



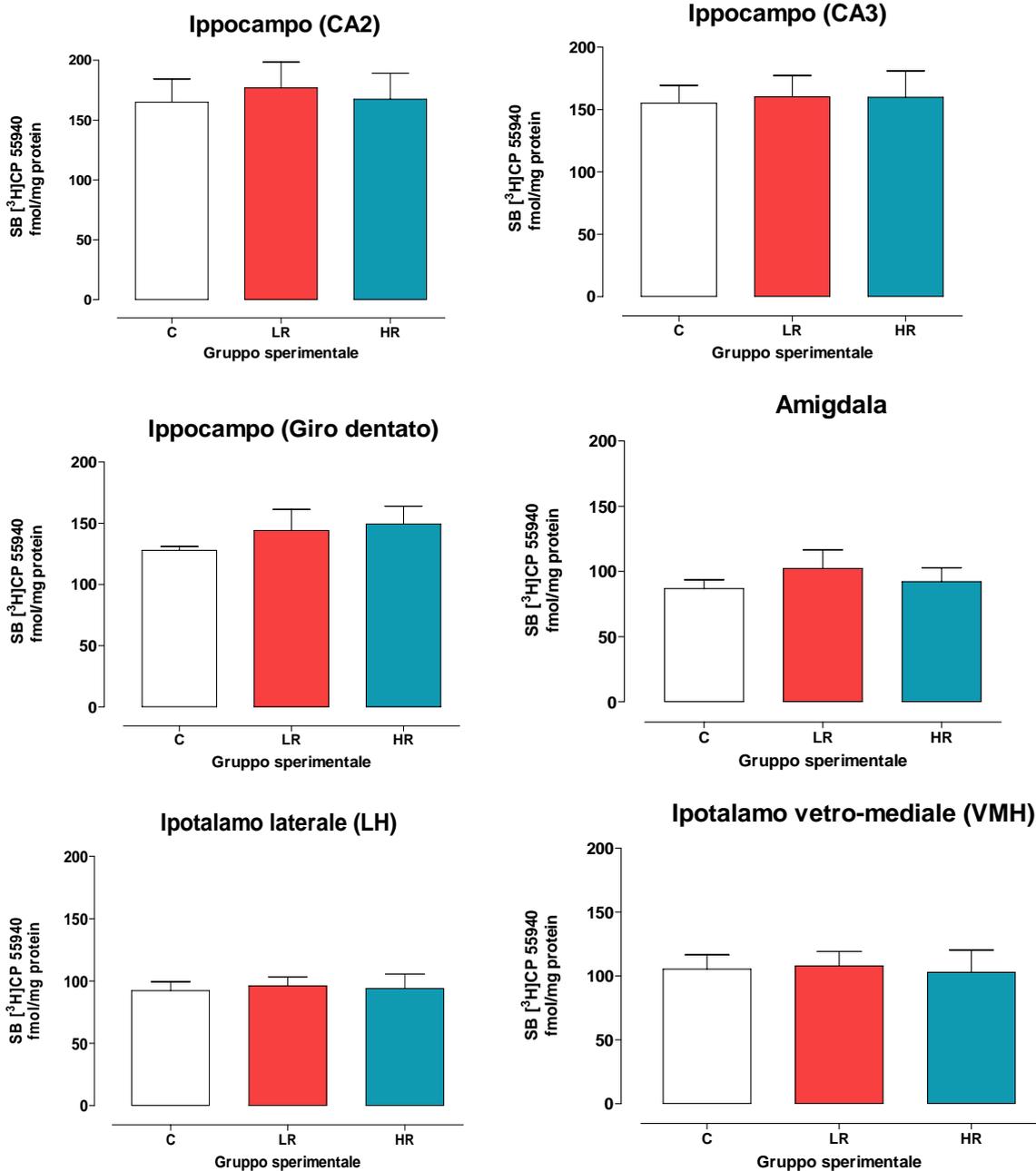


Fig.31: Effetto della dieta sulla densità dei recettori CB1 (margarina +chow: HR e LR; solo chow: C) nelle aree cerebrali analizzate I dati sono espressi come media \pm SEM ed espresse in fmol/mg protein del legame specifico del [3H]CP55940.

L'ANOVA ad una via effettuata all'interno di tutte le aree cerebrali analizzate, conferma che non si evidenziano significative differenze tra il gruppo degli animali di controllo C comparati con i gruppi LR ed HR. Essi sono i seguenti: **Cg1:** $F_{(2,9)}=0,1907$ $p=0,8296$; **Cg3:** $F_{(2,9)}=0,1260$, $p=0,8831$; **NAc Core:** $F_{(2,9)}=0,4842$, $p=0,6314$; **NAc Shell:** $F_{(2,9)}=0,2522$, $p=0,7824$; **CPu:** $F_{(2,9)}=0,08618$, $p=0,9182$,

CA₁: $F_{(2,9)}=0,1034$, $p=0,9029$; **CA₂**: $F_{(2,9)}=0,09090$, $p=0,9139$; **CA₃**: $F_{(2,9)}=0,02682$, $p=0,9736$; **Dg**:
 $F_{(2,9)}=28.64$, $p=0,5146$; **Amy**: $F_{(2,9)}=0,5048$, $p= 0,6198$; **LH**: $F_{(2,9)}=0,04721$, $p=$
 $0,9541$; **VMHF** $F_{(2,9)}=0,03183$, $p= 0,9688$.

DISCUSSIONE

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nell'eziopatogenesi del BED e nell'individuare in tale sistema un possibile target molecolare per lo sviluppo di farmaci efficaci nel trattamento di tale patologia. A tale scopo, come già precedentemente enunciato, abbiamo utilizzato un valido modello animale di BED in cui gli animali sono stati sottoposti ad un regime di accesso intermittente (3 giorni/settimana) e limitato (2h) ad una dieta ricca in grassi (margarina) per diverse settimane in aggiunta ad un accesso continuo di chow ed acqua (gruppo HR). Gli animali nonostante non fossero in una condizione d'alimentazione svantaggiata in quanto non sono mai stati sottoposti a digiuno, sviluppano un comportamento di ricerca compulsiva nei confronti della margarina stessa (Corwin et al., 1998). Tale comportamento si traduce, in questi animali, in un'assunzione di margarina significativamente superiore a quella degli animali con un accesso giornaliero limitato alla stessa (gruppo LR), e tale comportamento si mantiene stabile per lunghi periodi di tempo (Corwin e Buda-Levin, 2004; Corwin e Wojnicki, 2006). Abbiamo deciso di utilizzare questo modello animale poiché riproduce alcuni aspetti chiave della patologia umana. Uno di questi è, senza dubbio, il consumo di una grande quantità di cibo in un breve e definito periodo di tempo, quantità che è notevolmente superiore rispetto a quella consumata dagli animali di controllo. Inoltre gli animali non sono mai stati privati del cibo standard, condizione del tutto simile a quella che si evidenzia nel paziente affetto da BED che sviluppa questo comportamento d'assunzione compulsiva di cibo a prescindere dalla sensazione di fame e quindi dalle necessità fisiologiche dell'organismo (Marcus e Kalarchian, 2003). Gli esperimenti realizzati durante questa tesi dottorale, in base agli obiettivi prefissati, sono stati raggruppati principalmente in tre disegni sperimentali. Il primo si è focalizzato sulla caratterizzazione comportamentale degli animali mostranti il comportamento di binge eating; il secondo ha studiato l'effetto della manipolazione farmacologica del sistema endocannabinoide sul comportamento di binge eating; il terzo si è basato sull'analisi della densità dei recettori CB₁ nelle aree coinvolte nel comportamento

alimentare e nei meccanismi di gratificazioni derivanti dall'assunzione di cibo palatabile negli animali mostranti il comportamento di binge.

Studi comportamentali

Come descritto precedentemente, l'alimentazione compulsiva è accompagnata nella sua immediatezza, da emozioni e sentimenti positivi come per esempio una riduzione dell'ansia e della fame, sentendosi così sollevati. Successivamente, a distanza più o meno lunga dall'episodio di binge, tali sentimenti positivi lasciano spazio a quelli negativi: la stessa ansia che si era attenuata con l'avvento delle abbuffate, si ripresenta più marcata di prima con annessi anche agitazione, depressione, disgusto, vergogna e senso di colpa per il comportamento appena terminato. Gli studi comportamentali sono stati condotti allo scopo di valutare il grado di depressione e di ansietà degli animali mostranti il comportamento di binge eating prima dell'accesso alla margarina (fase di pre-binge) e dopo che è stato concluso l'episodio di binge (fase post-binge). I risultati ottenuti mostrano che nel test del nuoto forzato, quindi per ciò che concerne la valutazione del comportamento simil-depresso dell'animale, non esiste nessuna differenza significativa tra gli animali HR prima e dopo l'accesso alla margarina. Nessuna differenza significativa è stata inoltre evidenziata quando messi a confronto con gli altri due gruppi sperimentali (LR e C). Una delle spiegazioni plausibili del fatto che nei nostri animali mostranti il comportamento di binge eating non si evidenzia uno stato simil-depressivo, potrebbe essere imputabile al tipo di modello animale utilizzato. Al contrario, i risultati del test dell'*elevated plus-maze* per la valutazione del grado di ansietà hanno evidenziato che all'interno del gruppo HR, tra la fase di pre-binge e quella di post-binge esiste una differenza significativa sia nella percentuale di tempo che gli animali spendono nei bracci aperti sia nella percentuale di entrate negli stessi bracci, indicando un minore stato d'ansia degli animali dopo l'accesso alla margarina. Una spiegazione plausibile potrebbe essere quella in cui la margarina essendo un cibo ricco in grassi altamente palatabile, attivi direttamente il circuito di *reward* producendo un'immediata sensazione di benessere (Rossetti et al., 2013). Questo risultato potrebbe

quindi essere paragonabile alla situazione umana nella quale il soggetto, spinto da stati emotivi particolari, mette in atto un'abbuffata che ha come effetti immediati la riduzione degli stati negativi emotivi come l'ansia.

Studi farmacologici

Nel presente studio sono stati valutati gli effetti della modulazione farmacologica del sistema endocannabinoide sul comportamento di binge presenti negli animali HR. I risultati ottenuti, confermando quelli precedentemente commentati nelle premesse, evidenziano che una modulazione positiva del sistema endocannabinoide mediante la somministrazione dell'agonista cannabinoide WIN 55,212, non modifica in maniera sostanziale il comportamento di ricerca compulsiva nei confronti del cibo appetibile (margarina): nel gruppo degli animali mostranti il comportamento di binge eating (HR), dopo trattamento con l'agonista cannabinoide, il consumo di margarina rimane pressochè uguale agli animali HR trattati con il veicolo. Al contrario, nel gruppo LR, nel quale non c'è una ricerca compulsiva per la margarina, la dose più alta testata è in grado di aumentare in forma significativa l'introito calorico derivante da questa dieta. Infine l'agonista cannabinoide WIN 55,212 induce un aumento significativo del consumo di cibo standard, ad entrambe le dosi testate, solamente nel gruppo degli animali HR e non negli LR o nei controlli assoluti.

Un'altra via attraverso la quale è possibile modulare positivamente e quindi aumentare il segnale mediato dagli endocannabinoidi è quella che utilizza farmaci in grado di bloccare la loro degradazione. La modulazione del sistema endocannabinoide mediante composti che incrementano i livelli cerebrali degli endocannabinoidi è stata effettuata tramite la somministrazione dell'URB597, inibitore della FAAH, principale enzima responsabile della degradazione dell'AEA (come descritto precedentemente nell'introduzione) e del JZL 184, inibitore selettivo delle monoacilglicerolipasi (MAGL), enzima responsabile della degradazione del 2-AG. L'URB597 non ha determinato alcuna modificazione significativa nel consumo di margarina sia nel gruppo HR che nel gruppo LR così come nel consumo di cibo standard, dove è stato evidenziato, però, un trend

positivo anche se non statisticamente significativo rispetto agli animali trattati con il solo veicolo. Il mancato effetto di questo composto sulla margarina e sul cibo standard osservato nel nostro studio, potrebbe essere imputabile alla via di somministrazione utilizzata. E' stato infatti dimostrato che l'infusione diretta, nel nucleo parabrachiale di un altro inibitore della FAAH, l'arachidonoil serotonina, aumenta il consumo di cibo palatabile ad alto contenuto calorico (grassi e zuccheri) rispetto al consumo di cibo standard (DiPatrizio e Simanski, 2008) e questo effetto sembra essere CB_1 mediato dato che l'antagonista di questi recettori, l'AM251, risulta efficace nel bloccarlo. Inoltre, Soria-Gomez e collaboratori (2007) hanno dimostrato che l'infusione diretta di questo stesso composto direttamente nella shell del nucleo accumbens aumenta il consumo di cibo standard. Anche in questo caso, l'AM251 è stato in grado di bloccare questo effetto. Il blocco della FAAH tramite l'URB597 aumenta in maniera significativa i livelli di AEA senza andare a modificare i livelli del 2-AG (Fegley et al., 2005). Il 2-AG al pari dell'AEA sembra rivestire un ruolo importante nella regolazione del comportamento alimentare, sia per ciò che riguarda la componente omeostatica che quella edonica (Kirkham et al., 2002). Per tale motivo, è stato importante valutare anche un possibile effetto di un aumento dei livelli endogeni di questo endocannabinoide nel nostro modello di BED. A tale scopo abbiamo utilizzato il JZL184 che produce un'inibizione di circa l'85 % delle MAGL tissutali incrementando i livelli di 2-AG di circa otto volte rispetto ai quelli basali, e questo aumento dura per un periodo di tempo piuttosto lungo (≥ 8 h) (Long et al., 2009). Al pari del THC e del WIN 55,212, il JZL 184, così come era stato evidenziato con la somministrazione dell'URB597, non determina alcuna modificazione significativa sul consumo di margarina nel gruppo degli animali HR. Al contrario, entrambe le dosi testate, determinano un aumento del consumo di margarina nel gruppo LR. Il mancato effetto del WIN 55,212 e del JZL 184 sul consumo di margarina nel gruppo HR potrebbe essere imputabile al fatto che in questi animali l'attivazione del sistema endocannabinoide che potrebbe essere coinvolto nel comportamento dell'assunzione compulsiva di cibo palatabile è già ai livelli massimali per cui

non induce un ulteriore aumento del consumo di cibo. Al contrario, l'effetto oressizzante dei due composti è ben evidente nel gruppo LR nel quale è in grado di elevare il consumo di margarina portandolo a valori simili a quelli del gruppo HR. Questo effetto risulta essere selettivo per il cibo altamente palatabile, visto che non si riscontrano modificazioni significative sul consumo di cibo standard e sembrerebbe avvalorare l'ipotesi che in alcune condizioni i cannabinoidi aumentano in maniera selettiva il consumo di cibo altamente palatabile (Foltin et al., 1986; Koch e Matthews, 2001).

Una volta conclusa la parte riguardante gli effetti di una modulazione positiva del segnale del sistema endocannabinoide, il passo successivo è stato quello di valutare l'effetto della somministrazione acuta del cannabidiolo (CBD), componente non psicoattivo della cannabis. Il meccanismo attraverso il quale il CBD esercita i suoi effetti non è ancora del tutto chiaro: evidenze sperimentali dimostrano che, nonostante possieda bassa affinità per i recettori CB₁ (Pettit et al., 1998), questo composto è in grado sia di antagonizzare l'effetto degli agonisti cannabinoidi (Pertwee et al., 2002; Zuardi et al., 1981) che di bloccare la ricaptazione dell'AEA (Bisogno et al., 2001). È stato dimostrato che la somministrazione sistemica di CBD non è in grado di modificare il consumo di cibo in animali a digiuno o alimentati normalmente (Wiley et al., 2005; Scopinho et al., 2011). Al contrario è stata dimostrata la sua capacità di antagonizzare gli effetti iperfagici di agonisti CB₁ (Scopinho et al., 2011) e la sua abilità nel ridurre il peso corporeo se somministrato cronicamente, effetto che sembrerebbe essere mediato dai recettori CB₂ in quanto antagonizzato dall'azione dell'AM630, antagonista selettivo di tali recettori (Jankowska et al., 2011). Ipotizzando un elevato tono endocannabinoide nella patogenesi del BED e vista la capacità del CBD di antagonizzare gli effetti iperfagici di agonisti CB₁, è stato interessante valutare questo composto nel nostro modello animale di BED. In linea con i dati presenti in letteratura, il CBD, non è stato in grado di modificare il comportamento di binge eating nel gruppo degli animali HR. La sua somministrazione non ha prodotto nessuna modificazione significativa nel consumo di margarina

nemmeno negli animali LR e tanto meno nel consumo di cibo standard in tutti i gruppi sperimentali considerati.

La modulazione negativa del sistema endocannabinoide, quindi una diminuzione del segnale mediato da questo sistema, è stata effettuata mediante la somministrazione acuta del rimonabant producendo un blocco farmacologico selettivo del recettore CB₁. Risultati ottenuti in esperimenti sviluppati precedentemente nei nostri laboratori, mostrano che questo farmaco è in grado di bloccare la ricerca compulsiva della margarina nel gruppo HR in maniera dose-dipendente (0.3 e 3 mg/kg). L'effetto del rimonabant è evidente anche nel gruppo LR ma in questo caso solo alla dose più alta del farmaco ovvero 3 mg/kg. Il rimonabant è in grado di ridurre in tutti e tre i gruppi sperimentali del nostro studio, il consumo del cibo standard. Nonostante l'effetto generale di riduzione del consumo di cibo in accordo con quanto già presente in letteratura (McLaughling et al., 2003), il rimonabant nel gruppo HR sembra agire in maniera più specifica verso il comportamento di ricerca compulsiva della margarina, cibo palatabile, in quanto efficace già alla dose più bassa di 0.3 mg/kg. A tale proposito, è importante evidenziare il fatto che la stessa dose non è invece efficace nel ridurre in maniera significativa il consumo di margarina nel gruppo LR, per cui è possibile escludere che l'effetto del rimonabant nel gruppo HR sia imputabile solo ad un effetto generale di riduzione del consumo di cibo. Considerando i risultati appena descritti, è stato importante verificare se l'effetto del rimonabant in acuto alla dose minima efficace testata potesse essere mantenuto anche durante un trattamento cronico. In questi esperimenti si evidenzia che il rimonabant, somministrato cronicamente per tre settimane, è stato in grado di ridurre selettivamente il consumo di cibo altamente palatabile rispetto a quello standard sia nel gruppo di animali LR che negli HR. Tale effetto perdurava durante tutte e tre le settimane di trattamento senza andare incontro a tolleranza. Essendo tale effetto specifico solo a carico del cibo altamente palatabile, viene avvalorata l'ipotesi che gli antagonisti CB₁ siano in grado di ridurre selettivamente il consumo di cibo altamente palatabile. Allo stato attuale, come specificato da Berner e collaboratori (2011),

l'effetto anoressizzante degli antagonisti del recettore CB₁ sul cibo palatabile consumato sotto forma di abbuffate non era stato ancora dimostrato. Inoltre, un altro risultato importante da evidenziare è stato che il trattamento cronico con rimonabant riduce l'assunzione di cibo standard solamente nel gruppo degli animali di controllo (C) per le prime due settimane andando incontro poi a tolleranza farmacologica. Nel nostro studio, è stato dimostrato che il trattamento cronico con il rimonabant riduce anche il peso corporeo nel gruppo HR (che risultava essere aumentato alla fine della fase di induzione), ma non nel gruppo C e LR. Questa evidenza è in linea con altri studi dove veniva mostrato come l'antagonismo dei recettori CB₁ fosse in grado di ridurre il peso corporeo di ratti obesi o di ratti con accesso ad un cibo ricco in grassi e zuccheri (Mathes et al., 2008; Martín-García et al., 2010). Anche se il meccanismo con il quale il rimonabant esercita i suoi effetti sul comportamento di binge eating deve essere ancora chiarito, precedenti evidenze sperimentali suggeriscono che esso potrebbe essere effettivo nel sopprimere la risposta edonica prodotta dal consumo di cibo palatabile (Cota et al., 2006). Numerosi studi sottolineano come il sistema endocannabinoide costituisca un elemento importante dei substrati neuronali coinvolti nei processi di rinforzo e di gratificazione implicati nell'assunzione di cibo (Di Marzo e Matias, 2005). In linea con questo, i recettori CB₁ sono altamente espressi nelle aree cerebrali (nucleo accumbens, ippocampo, nucleo entopeduncolare) che sono direttamente implicate nella regolazione dell'aspetto edonico del cibo (Herkenham et al., 1990). La somministrazione locale di endocannabinoidi nel nucleo accumbens, in particolar modo nel parte dorsale della shell, esercita una potente azione iperfagica mediata dall'attivazione dei recettori CB₁ (Kirkham et al., 2002; Soria-Gómez et al., 2007) ed aumenta le proprietà edoniche del sucrosio (Mahler et al., 2007). E' ben riconosciuto il fatto che il cibo palatabile stimoli il rilascio di dopamina nella shell del nucleo accumbens in forma del tutto simile alle droghe d'abuso (Martel e Fantino, 1996): tale rilascio è bloccato dalla somministrazione di rimonabant (Melis et al., 2007), suggerendo che la risposta edonica al cibo palatabile potrebbe dipendere dal sistema endocannabinoide probabilmente attraverso la

modulazione del sistema mesolimbico. Va notato che il rilascio di dopamina scompare con l'accesso ripetuto al cibo palatabile (Bassareo e Di Chiara, 1997), effetto però non riscontrato in seguito ad esposizione a sostanze d'abuso (Wise et al., 1995). E' stato dimostrato che negli animali che mostrano un comportamento di binge eating nei confronti di una soluzione al 10% di saccarosio, si evidenzia un continuo rilascio di dopamina in corrispondenza di ogni abbuffata (Rada et al., 2005). Lo stesso effetto è stato evidenziato in seguito ad consumo compulsivo di cibo palatabile ricco in grassi (Liang et al., 2006). Quindi, in base a queste evidenze sperimentali, l'effetto del rimonabant sul gruppo mostrante il comportamento di binge eating potrebbe essere relazionato con la sua capacità di bloccare il rilascio di dopamina nel nucleo accumbens indotto dal consumo di margarina.

Il coinvolgimento dei recettori CB₁ nel controllo del comportamento alimentare è stato ampiamente dimostrato, mentre quello dei recettori CB₂ non è ancora del tutto chiarito. Recenti evidenze sperimentali dimostrano la presenza di questi recettori in diversi nuclei ipotalamici implicati nella regolazione del comportamento alimentare (Gong et al., 2006). Studi genetici effettuati su popolazioni umane dimostrano che, un polimorfismo a carico del gene che codifica per il recettore CB₂ che porta alla sostituzione della glutamina in arginina in posizione 63 (R63Q), è associato all'insorgenza di disturbi alimentari. Questa evidenza sperimentale suggerisce che tale recettore sia coinvolto nei meccanismi di segnalizzazione del sistema endocannabinoide associati alla regolazione del comportamento alimentare e la sua disregolazione presente nei disturbi alimentari. Evidenze sperimentali mettono in luce come somministrazioni intra-cerebro-ventricolari (ICV) dell'AM630, un antagonista selettivo dei recettori CB₂, aumentano il consumo di cibo standard in animali deprivati di cibo (overnight) (Werner e Koch 2003) e questo dato è stato confermato da Onaivi e collaboratori (2008) che hanno riscontrato un aumento del consumo di cibo standard in topi sottoposti a deprivazione di cibo (12 h) in seguito a somministrazione periferica dello stesso antagonista. Sulla base di queste premesse, è valutato il coinvolgimento di tali recettori nel modello

animale di BED attraverso la somministrazione acuta dell'AM630. Né il consumo di cibo altamente palatabile né quello di cibo standard viene modificato dal blocco dei recettori CB2 in nessuno dei tre gruppi sperimentali considerati, portando ad escludere momentaneamente il coinvolgimento di tali recettori nel BED.

Come già precedentemente descritto, l'AEA appartiene alla famiglia delle aciletanolamidi della quale fanno parte anche l'OEA e la PEA. Diversi studi hanno evidenziato un ruolo chiave dell'OEA nel bilancio energetico (promuove la sazietà e la lipolisi attraverso l'attivazione dei recettori PPARs; Fu et al., 2003) mettendo in risalto le sue proprietà anoressizzanti. Questa molecola, quindi, ha un effetto anoressizzante inducendo l'espressione di ossitocina nel PVN dell'ipotalamo e, in accordo con quanto appena detto, risultati clinici preliminari hanno evidenziato livelli di OEA alterati nel liquido cerebrospinale e nel plasma di soggetti affetti da disturbi alimentari (Gaetani et al., 2008). Per quanto riguarda la PEA è stato dimostrato che riduce l'assunzione di cibo e del peso corporeo in ratte ovariectomizzate, attraverso un meccanismo che coinvolge la regolazione del segnale della leptina a livello ipotalamico (Mattace et al., 2014). Al contrario di quanto dimostrato in letteratura, la somministrazione di OEA, PEA nonché dell'agonista sintetico per i recettori PPAR α clofibrato, non ha determinato alcuna modificazione significativa del comportamento di binge eating presente nei nostri animali.

Studi biochimici

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che alcune condizioni alimentari (componenti alimentari specifici, nonché un'alimentazione compulsiva o una dieta restrittiva) influenzano l'espressione dei recettori CB₁ in diverse aree cerebrali. Una di queste evidenze, mostra come in ratti esposti ad una dieta altamente palatabile ricca in zuccheri (saccarosio e latte condensato), per dieci settimane, si evidenzia una significativa riduzione del 30-50% dei recettori CB₁ nell'ippocampo, nella corteccia, nel NAcc e nel nucleo entopeduncolare che risulta essere inversamente

correlata con l'assunzione di cibo appetibile (Harrold et al., 2002). Un altro studio ha dimostrato che, topi alimentati con una dieta ricca in grassi durante 20 settimane, riducesse la densità dei recettori CB₁ nella sostanza nigra e nella VTA, confrontati con i topi nutriti con una dieta ricca di carboidrati e povera di grassi (South et al. 2008). In accordo con quanto sopra menzionato, Timofeeva e collaboratori (2009) dimostrarono che, l'esposizione a lungo termine ad una dieta palatabile estremamente calorica provoca una diminuzione significativa dei livelli di espressione di mRNA del recettore CB₁ nella corteccia cingolata, ventromediale e nuclei ipotalamici parvocellulari. Gli esperimenti di autoradiografia da noi condotti sulla densità dei recettori CB₁, hanno dimostrato che la dieta ricca in grassi utilizzata per l'induzione del modello animale di BED non modifica la densità di tali recettori in nessuna delle aree cerebrali considerate implicate nella componente omeostatica ed in quella edonica del cibo quali ad esempio ipotalamo, Nacc, ippocampo, amigdala, striato ecc. A tutt'oggi, solo un lavoro, ha esaminato la densità dei recettori CB₁ in un modello animale di BED. Infatti, Bello e collaboratori (2012) hanno esaminato l'espressione dell'mRNA del recettore CB₁ nel cervello di ratte femmine sottoposte ad una dieta altamente palatabile con diverse modalità di accesso tra le quali anche l'accesso intermittente che porta poi all'induzione del comportamento di binge eting. Essi mostrarono che sia l'mRNA che la densità dei recettori CB₁ era influenzata dalle condizioni alimentari degli animali, quindi dall'accesso alla dieta palatabile anche se, tali modificazioni, non erano specifiche per il paradigma alimentare utilizzato per l'induzione del binge. Nello specifico, gli animali che avevano un continuo accesso alla dieta altamente palatabile (HP, grasso vegetale con il 10% di saccarosio) mostravano un aumento dei livelli di mRNA del recettore CB₁ nel nucleo del tratto solitario evidenziando inoltre un notevole aumento di peso corporeo e adiposità. Al contrario, una riduzione approssimativamente del 20% dell'mRNA CB₁ è stata riscontrata nella corteccia cingolata di ratto esposto ad un paradigma di alimentazione intermittente rispetto al gruppo di controllo che invece

possedeva una alimentazione ad libitum. La densità recettoriale era ridotta del circa 30% nella shell del NAc nel gruppo di animali che avevano accesso al cibo altamente palatabile in forma continua.

CONCLUSIONI

In conclusione, possiamo affermare che i risultati ottenuti in questa tesi mostrano che la manipolazione farmacologica del sistema endocannabinoide sembrerebbe essere efficace nel modulare il comportamento di binge in un modello animale di BED evidenziando che tale sistema potrebbe svolgere un ruolo importante nella neurobiologia di tale disturbo.

BIBLIOGRAFIA

- Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschöp MH, Gao XB, Horvath TL. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3229-39.
- Alger SA, Schwalberg MD, Bigaouette JM, Michalek AV, Howard LJ. Effect of a tricyclic antidepressant and opiate antagonist on binge-eating behavior in normoweight bulimic and obese, binge-eating subjects. *Am J Clin Nutr.* 1991 Apr;53(4):865-71.
- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5™). Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
- Anderson-Baker WC, McLaughlin CL, Baile CA. Oral and hypothalamic injections of barbiturates, benzodiazepines and cannabinoids and food intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 11: 487-91.
- Arnold LM, McElroy SL, Hudson JI, Welge JA, Bennett AJ, Keck PE. A placebo-controlled, randomized trial of fluoxetine in the treatment of binge-eating disorder. *J Clin Psychiatry.* 2002 Nov;63(11):1028-33
- Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, Le Fur G. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology.* 1997;132:104–106.
- Arnow et al. (1992), Binge eating among the obese: a descriptive study. *Journal of Behavioral Medicine;* 15, 155-170.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:29–39.
- Avena, N.M., Bocarsly, M.E., 2012. Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. *Neuropharmacology* 63 (1), 87-96.
- Baker D, Pryce G. The therapeutic potential of cannabis in multiple sclerosis. *Expert Opin Invest Drugs.* 2003; 12(4): 561-567.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Jan;27(1):1-4.
- Bassareo V, Di Chiara G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to

- food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci.* 1997 Jan 15;17(2):851-61.
- Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci.* 2012 Mar 14;6:9.
- Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci.* 2012 Mar 14;6:9.
 - Begg, M., Pacher, P., Batkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertaler, L., Mo, F.M., Liu, J. y Kunos, G. (2005) "Evidence for novel cannabinoide receptors". *Pharmacology and Therapeutics* 106: 133-145.
 - Bello NT, Coughlin JW, Redgrave GW, Ladenheim EE, Moran TH, Guarda AS. Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. *PhysiolBehav* 2012; 105: 720-6.
 - Berner LA, Bocarsly ME, Hoebel BG, Avena NM. Pharmacological interventions for binge eating: lessons from animal models, current treatments, and future directions. *Curr Pharm Des* 2011;17(12):1180-7. Review.
 - Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001 Oct;134(4):845-52.
 - 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.
 - Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5):567-75. Epub 2007 Oct 1. Review
 - Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1139:450-7.
 - Bulik, C.M., Tozzi, F., 2004. The genetics of bulimia nervosa. *Drugs Today* 40 (9), 741-749.
 - Cani PD, Montoya ML, Neyrinck AM, Delzenne NM, Lambert DM. Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br J Nutr* 2004; 92: 757-61.

- Carai, M.A., Colombo, G., Maccioni, P., Gessa, G.L., 2006. Efficacy of rimonabant and other cannabinoid CB1 receptor antagonists in reducing food intake and body weight: preclinical and clinical data. *CNS Drug Rev* 12 (2), 91-99.
- Castelli MP, Piras AP, Melis T, Succu S, Sanna F, Melis MR, Collu S, Ennas MG, Diaz G, Mackie K, Argiolas A. Cannabinoid CB1 receptors in the paraventricular nucleus and central control of penile erection: immunocytochemistry, autoradiography and behavioral studies. *Neuroscience*. 2007 Jun 15;147(1):197-206.
- Chaperon F, Soubrié P, Puech AJ, Thiébot MH. Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology* 1998; 135: 324-32.
- Chiang KP, Gerber AL, Sipe JC, Cravatt BF. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Hum Mol Genet*. 2004 Sep 15;13(18):2113-9.
- Childers SR. Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS J*. 2006 Mar 10;8(1):E112-7. Review
- Corwin RL, Buda-Levin A (2004). Behavioral models of binge-type eating. *PhysiolBehav* 82: 123–130.
- Corwin RL, Avena NM, Boggiano MM. Feeding and reward: perspectives from three rat models of binge eating. *PhysiolBehav*. 2011 Jul 25;104(1):87-97.
- Corwin RL, Wojnicki FH, Fisher JO, Dimitriou SG, Rice HB, Young MA. Limited access to a dietary fat option affects ingestive behavior but not body composition in male rats. *Physiol Behav*. 1998 Dec 1;65(3):545-53.
- Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U (2003) Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J ObesRelatMetabDisord* 27:289–301.
- Cota D, Tschöp MH, Horvath TL, Levine AS. Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res Rev*. 2006 Jun;51(1):85-107.
- Coutts AA y Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(6): 572-579.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):83-7.

- Davis C, Levitan RD, Kaplan AS, Carter J, Reid C, Curtis C, Patte K, Kennedy JL. Dopamine transporter gene (DAT1) associated with appetite suppression to methylphenidate in a case-control study of binge eating disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Oct;32(10):2199-206.
- Davis, C., Carter, J.C. Compulsive overeating as an addiction disorder. A review of theory and evidence. *Appetite* 2009; 53 (1),1-8.
- Davis C, Levitan RD, Yilmaz Z, Kaplan AS, Carter JC, Kennedy JL. Binge eating disorder and the dopamine D2 receptor: genotypes and sub-phenotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012 Aug 7;38(2):328-35.
- De Petrocellis L, Chu CJ, Moriello AS, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V. Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br J Pharmacol*. 2004 Sep;143(2):251-6.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988 Nov;34(5):605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9.
- Dewey WL, (1986) Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 38(2):151-78.
- Dichter, G.S., Damiano, C.A., Allen, J.A., 2012. Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. *J Neurodev Disord* 4 (1), 19.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; 410: 822-5.
- Di Marzo V. et al. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci*. 2005; 8:585-589.
- Dingemans AE, Bruna MJ and van Furth EF: Binge eating review. *International Journal of Obesity*, 26, 299-307, 2002.
- Dipatrizio NV, Simansky KJ. Inhibiting parabrachial fatty acid amide hydrolase activity selectively increases the intake of palatable food via cannabinoid CB1 receptors. *Am J PhysiolRegulIntegrComp Physiol* 2008; 295: 1409-14.

- Dodd GT, Stark JA, McKie S, Williams SR, Luckman SM. (2009) Central cannabinoid signaling mediating food intake: a pharmacological-challenge magnetic resonance imaging and functional histology study in rat. *Neuroscience*. 163:1192-1200.
- Egecioglu E, Jerlhag E, Salomé N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly-Y M, Andersson D, Bjursell M, Perrissoud D, Engel JA, Dickson SL. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol*. 2010 Jul;15(3):304-11
- Egertova M., Elphick M. R. Localization of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. *J Comp Neurol* 2000; 422: 159–171.
- Egertova M., Giang D. K., Cravatt B. F., Elphick M. R. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc R Soc London B Biol Sci* 1998; 265: 2081–2085.
- Emadi L, Jonaidi H, Hosseini Amir Abad E. The role of central CB2 cannabinoid receptors on food intake in neonatal chicks. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2011 Dec;197(12):1143-7.
- Faiburn CG, Harrison P.J. (2003). Eating Disorders. *Lancet*. 2003. 361: 407-416.
- Fegley D, Gaetani S, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, and Piomelli D (2005) Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 313:352–358.
- Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM, Matsuda LA. Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol*. 1992 Nov;42(5):838-45.
- Fernández-Ruiz, JJ., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S., Ramos, JA. Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *PLEFA* 66: 257-267, 2003.
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Jan;28(1): 39-45.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci*.2007;30:289-316. Review.
- Figlewicz DP, Bennett JL, Naleid AM, Davis C, Grimm JW. Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. *Physiol Behav*. 2006 Nov 30;89(4):611-6.

- Flynn MC, Plata-Salaman CR, French-Mullen JM. Neuropeptide Y-related compounds and feeding. *Physiol Behav.* 1999;65(4–5):901–905.
- Foltin RW, JV Brady, MW Fischman. Behavioral analysis of marijuana effects on food intake in humans. *Pharmacol, BiochemBehav.* 1986; 25 (3): 577–582.
- Foltin RW, MW Fischman, MF Byrne. Effects of smoked marijuana on food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. *Appetite* 1988; (11):1–14.
- Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Konje JC, Bell SC, Teixeira NA. Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;(7):121.
- Frank, G.K., 2013. Altered brain reward circuits in eating disorders: chicken or egg?. *Curr Psychiatry Rep* 15 (10): 396.
- Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology.* 2005 Jun;48(8):1147-53.
- 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. *Regulat. Pept.* 92 (1–3), 31–35.
- Gaetani, S., Kaye, W.H., Cuomo, V., and Piomelli, D.(2008). Role of endocannabinoids and their analogues in obesity and eating disorders. *Eat. Weight Disord.* 13, e42 - e48.
- Gamber KM, Macarthur H, Westfall TC. Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* 2005; 49: 646-52.
- Gardner, E.L., 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 81 (2), 263-284.
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 1991 Oct 1; 279 (1):129-34.
- Glass M., Dragunow M., Faull R. L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997; 77: 299–318.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 2006 Feb 3;1071(1):10-23.

- Grilo, C.M., White, M.A., Masheb, R.M., 2009. DSM-IV psychiatric disorder comorbidity and its correlates in binge eating disorder. *Int J Eat Disord*, 42 (3), 228-234.
- Grotenhermen F. Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005 Oct;4(5):507-30. Review
- Grunstein RR e coll.: Impact of obstructive apnoea and sleepiness on metabolic and cardiovascular risk factors in Swedish Obese Subjects (SOS). *International Journal of Obesity*, 19, 410-418, 1995.
- Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. *Nutr J*. 2014 Feb 14;13(1):17.
- Guertin TL. Eating behavior of bulimics, self-identified binge eaters, and noneating-disordered individuals: what differentiates these populations? *Clin Psychol Rev* Jan 1999;19:1–23.
- Guss JL, Kissilef HR, Walsh BT, Devlin MJ. Binge eating behavior in patients with eating disorders. *Obes Res*. 1994 Jul;2(4):355-63.
- Hagan MM, Wauford PK, Chandler PC, Jarrett LA, Rybak RJ, Blackburn K. A new animal model of binge-eating: key synergistic role of past caloric restriction and stress. *Physiol Behav* 2002;77(1):45–54.
- Hájos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*. 2000 Sep;12(9):3239-49.
- Hansen, H.S., Moesgaard, B., Hansen, H.H., y Petersen, G. NAcylethanolamines and precursor phospholipids-relation to cel injury. *Chem Phys Lipids* 108: 135-150, 2000.
- Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 392: 147-56.
- Hansen DL, Toubro S, Stock MJ, Macdonald IA, Astrup A. The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Oct;23(10):1016-24.
- Harrold JA, Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G. Downregulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamicregions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res* 2002; 952: 232-8.

- Hart, C.L., Ward, A.S., Haey, M., Comer, S.D., Foltin, R.W. & Fishman, M.W. (2002) Comparison of smoked marijuana and oral D9-tetrahydrocannabinol in humans. *Psychopharmacology*, 164: 407–415.
- Hay PJ, Bacaltchuk J, Stefano S: Psychotherapy for bulimia nervosa and bingeing. *Cochrane Database Syst Rev* , 3, 2004:CD000562. Review.
- Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R., Melvin L. S., De Costa B. R., Rice K. C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991; 11: 563–583.
- Herkenham M., Lynn A. B., Little M. D., Johnson M. R., Melvin L. S., De Costa B. R., Rice K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1932–1936.
- Hermann H., Marsicano G., Lutz B. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 2002; 109: 451– 460.
- Hetherington A, Ranson S. The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *Am J Physiol*. 1942;136:609–617.
- Hirschfeld RM. Long-term side effects of SSRIs: sexual dysfunction and weight gain. *J Clin Psychiatry*. 2003;64 Suppl 18:20-4. Review
- Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids*. 2002; 121(1-2): 173-190.
- Hollister LE (1971) Hunger and appetite after single doses of marijuana, alcohol and dextroamphetamine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 12, 45–49.
- Howard CE, Porzelius LK. The role of dieting in binge eating disorder: etiology and treatment implications. *Clin Psychol Rev*. 1999 Jan;19(1):25-44.Review.
- Howlett A.C., Fleming R.M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 1984; 26(3): 532- 538.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 2004;47 Suppl 1:345-58.
- Huang SM, Bisogno T, Petros TJ, et al. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J Biol Chem* 2001;276:42639–44.

- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8400–5.
- Hudson JI, Hiripi E, Pope HG Jr, Kessler RC. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biol Psychiatry*. 2007;61(3):348–358.
- Ignatowska-Jankowska B, Jankowski MM, Swiergiel AH. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: involvement of CB2 receptors. *Neurosci Lett*. 2011 Feb 18;490(1):82-4.
- Jackson SJ, Diemel LT, Pryce G, Baker D. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J Neurol Sci*. 2005; 233(1-2): 21-25.
- Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1151-4.
- Javaras, K.N., Laird, N.M., Reichborn-Kjennerud, T., Bulik, C.M., Pope, H.G Jr., Hudson, J.I., 2008. Familiarity and heritability of binge eating disorder: results of a case-control family study and a twin study. *Int J Eat Disord* 41 (2), 174-179.
- Jerlhag E, Janson AC, Waters S, Engel JA. Concomitant release of ventral tegmental acetylcholine and accumbal dopamine by ghrelin in rats. *PLoS One*. 2012;7(11):e49557.
- Jhaveri MD, Elmes SJ, Richardson D, Barrett DA, Kendall DA, Mason R, Chapman V. Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB(2) receptors in the thalamus of neuropathic rats. *Eur J Neurosci*. 2008 Apr;27(7):1722-30.
- Kalra, S.P. Dube, M.G. Pu, S. Xu, B. Horvath, T.L. & Kalra, P.S. (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Review*, 20, 68–100.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, et al. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2438-43.
- Katona I, Sperl agh B, S ik A, K afalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 1999 Jun 1;19(11):4544-58.
- 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. *Physiol Behav* 86 (5), 773-795.

- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. 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* 2002; 136: 550-7.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol.* 2003 Oct;74(4):486-96. Epub 2003 Jul 1. Review.
- Koch JE, Matthews SM. Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. *NutrNeurosci* 2001; 4: 179-87.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999 402(6762):656-60.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 2008; 3: 1797.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, et al. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 137-54.
- Korotkova TM, Brown RE, Sergeeva OA, Ponomarenko AA, Haas HL. Effects of arousal- and feeding-related neuropeptides on dopaminergic and GABAergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Eur J Neurosci.* 2006 May;23(10):2677-85.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998 May 7;393(6680):72-6.
- Lanciego JL, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Conte-Perales L, Callén L, Roda E, Gómez-Bautista V, López IP, Lluís C, Labandeira-García JL, Franco R. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J Psychopharmacol.* 2011 Jan;25(1):97-104.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7): 2699-704.
- Liang NC, Hajnal A, Norgren R. Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: R1236-9.
- Linehan MM., Chen EY. (2005), Dialectical behavior therapy for eating disorders. In Freeman A., *Encyclopedia of Cognitive Behavior Therapy.* Springer, New York; pp. 168-171.

- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*. 2008 Jan;54(1):1-7.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavón FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*. 2009 Jan;5(1):37-44.
- Lupica CR, Riegel AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology* 2005; 48: 1105-16.
- Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J*. 2006 Apr 28;8(2):E298-306. Review.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992;48:655– 68.
- Mailleux P., Vanderhaeghen J.-J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992; 48: 655–668.
- Mahler SV, Smith KS, Berridge KC. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Nov;32(11):2267-78.
- Malhotra S, King KH, Welge JA, Brusman-Lovins L, McElroy SL. Venlafaxine treatment of binge-eating disorder associated with obesity: a series of 35 patients. *J Clin Psychiatry*. 2002 Sep;63(9):802-6.
- Manson JE e coll.: A prospective study of obesity and risk of coronary hearth disease in women. *New England Journal of Medicine*. 322, 882- 889, 1990.
- Marcus MD, Levine MD. Use of dialectical behavior therapy in the eating disorders. In: Brewerton TD, ed. *Clinical handbook of eating disorders. An integrated approach*. New York- Basel: Marcel Dekker Incorporation; 2004: 473-88.
- Markey SP, Dudding T, Wang TC. Base- and acid-catalyzed interconversions of O-acyl- and N-acyl-ethanolamines: a cautionary note for lipid analyses. *J Lipid Res*. 2000 Apr; 41(4):657-62.

- Marsicano G., Lutz B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4213–4225.
- Marsicano G., Moosmann B., Hermann H., Lutz B and Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80: 448-456, 2002.
- Martel P, Fantino M (1996). Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. *PharmacolBiochemBehav* 53: 221–226.
- Martín-García E, Burokas A, Martín M, Berrendero F, Rubí B, Kiesselbach C, Heyne A, Gispert JD, Millán O, Maldonado R. Central and peripheral consequences of the chronic blockade of CB1 cannabinoid receptor with rimonabant or taranabant. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(5):1338-13351.
- Masheb RM, Grilo CM. Emotional overeating and its associations with eating disorder psychopathology among overweight patients with binge eating disorder. *Int J Eat Disord* 2006; 39: 141-6.
- Mathes CM, Ferrara M, Rowland NE. Cannabinoid-1 receptor antagonists reduce caloric intake by decreasing palatable diet selection in a novel dessert protocol in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Jul;295(1):R67-75
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):561-4.
- Mato S, Del Olmo E, Pazos A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(9):1747-54.
- Mattace RG, Santoro A, Russo R, Simeoli R, Paciello O, Di CC, Diano S, Calignano A, Meli R. Palmitoylethanolamide prevents metabolic alterations and restores leptin sensitivity in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2014 Jan 15;en20131823.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 1995 Oct;15(10):6552-61.

- McCann, U.D. & Agras, W.S. (1990) Successful treatment of nonpurging bulimia nervosa with desipramine: a double-blind, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry*, 147, 1509-1513.
-
- McLaughlin PJ, Winston K, Swezey L, Wisniecki A, Aberman J, Tardif DJ, Bet AJ, Ishiwari K, Makriyannis A, Salamone JD. The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behavior in a variety of tasks in rats. *Behav Pharmacol*. 2003 Dec;14(8):583-8.
- McElroy SL, Casuto LS, Nelson EB, Lake KA, Soutullo CA, Keck PE Jr, Hudson JI. Placebo-controlled trial of sertraline in the treatment of binge eating disorder. *Am J Psychiatry*. 2000 Jun;157(6):1004-6.
- McElroy SL, Hudson JI, Capece JA, Beyers K, Fisher AC, Rosenthal NR. Topiramate for the treatment of binge eating disorder associated with obesity: a placebo-controlled study. *Biol Psychiatry* 2007; 61(9): 1039-48.
- Mechoulam R et al., (1984) Recent advances in the use of cannabinoids as therapeutic agents. In “The cannabinoids: chemical, pharmacologic and therapeutic aspects”. pp777-793 Academic press, Orlando, Florida.
- Mechoulam R. Interview with Prof. Raphael Mechoulam, codiscoverer of THC. Interview by Stanley Einstein. *Int J Addict*. 1986 Apr-May;21(4-5):579-87.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995): Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83–90.
- Melis M, Pistis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Gessa GL. Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci* 2004; 24: 53–62.
- Melis T, Succu S, Sanna F, Boi A, Argiolas A, Melis MR. The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *NeurosciLett*. 2007 Jun 4;419(3):231-5.
- Meye FJ, Adan RA. Feelings about food: the ventral tegmental area in food reward and emotional eating. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Jan;35(1):31-40.

- Miller CC, Murray TF, Freeman KG, Edwards GL. Cannabinoid agonist, CP 55,940, facilitates intake of palatable foods when injected into the hindbrain. *PhysiolBehav* 2004; 80: 611-6.
- Millhorn DE, Eldridge FL. Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. *J Appl Physiol* (1985). 1986 Oct;61(4):1249-63. Review.
- Mitchell KS, Neale MC, Bulik CM, Aggen SH, Kendler KS, Mazzeo SE. Binge eating disorder: a symptom-level investigation of genetic and environmental influences on liability. *Psychol Med.* 2010 Nov;40(11):1899-906.
- Moldrich G., Wenger T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 2000; 21: 1735–1742.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arevalo-Martin, A., Almazán, G.,Molina-Holgado, F., Borrel, J. and Guaza, C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/ Akt signalling. *J. Neurosci.* 22: 9742-9753, 2002.
- Monteleone P, Di Lieto A, Tortorella A, Longobardi N, Maj M. Circulating leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body weight, eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry Res.* 2000 May 15;94(2):121-9.
- Monteleone P, Fabrazzo M, Tortorella A, Fuschino A, Maj M. Opposite modifications in circulating leptin and soluble leptin receptor across the eating disorder spectrum. *Mol Psychiatry* 2002; 7:641-6.
- 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, 1216–1221.
- Monteleone P, Tortorella A, Castaldo E, Maj M. Association of a functionalserotonin transporter gene polymorphism with binge eating disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Jan 5;141B(1):7-9.
- Monteleone P, Tortorella A, Martiadis V, Di Filippo C, Canestrelli B, Maj M. The cDNA 385C to A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is associated with overweight/obesity but not with binge eating disorder in overweight/obese women. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 May;33(4):546-50.

- Monteleone, P., 2011. New frontiers in endocrinology of eating disorders. *Curr Top Behav Neurosci* 6, 189-208.
- Monteleone P, Maj M. Dysfunctions of leptin, ghrelin, BDNF and endocannabinoids in eating disorders: beyond the homeostatic control of food intake. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Mar;38(3):312-30.
- Morgan NH, Stanford IM, Woodhall GL. Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*. 2009 Sep;57(4):356-68.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, et al. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; 443: 289-95.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):61-5.
- Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, M., 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.
- Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol* 2004; 60: 153-60.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*. 2007 Aug;4(8):1842-57. Review
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasentfitz, L. y Uhl, G.R. (2006a). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain” *Ann. NY Acad. Sci*. 1074: 514-36.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Sejal, P., Meozzi, P.A., Myers, L., Tagliaferro, P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Sejal, P., Meozzi, P.A., Myers, L., Tagliaferro, P., Hope, B., Leonard, C.M., Uhl, G.R., Brusco, A. y Gardner, E. (2006b). Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression” *Methods Mol. Med*. 123: 291-8.
- Onaivi ES, Carpio O, Ishiguro H, Schanz N, Uhl GR, Benno R. Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1139:426-33.

- Onaivi ES. Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropharmacol.* 2011 Mar;9(1):205-8.
- Ong W. Y., Mackie K. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience* 1999; 92: 1177–1191.
- Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Harvey-White J, et al. Cocaine and amphetamine related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide. *Neuroendocrinology* 2005; 81: 273-82.
- O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5): 576-82.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 389-462.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006; 27: 73-100.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2006 Nov;20(13):2405-7.
- Parker E, Van Heek M, Stamford A. Neuropeptide Y receptors as targets for anti-obesity drug development: perspective and current status. *Eur J Pharmacol.* 2002 Apr 12;440(2-3):173-87. Review
- Pearlstein P, Spurrell E, Hohlstein LA, Gurney V, Read J, Keller MB. A double blind, placebo-controlled trial of fluvoxamine in binge eating disorder: a high placebo response. *Arch Womens Ment Health.* 2003.6(2):147-51.
- Pertwee RG, Ross RA, Craib SJ, Thomas A. (-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol.* 2002 Dec 5;456(1-3):99-106.
- Pettit D. A., Harrison M. P., Olson J. M., Spencer R. F., Cabral G. A. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 1998; 51: 391–402.
- Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4 (11), 873-884.
- Pisetsky EM, Chao YM, Dierker LC, May AM, Striegel-Moore RH. *Int J Eat Disord.* (2008) Jul;41(5):464-70.

- Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem*. 2010;17(14):1450-67.
- Polivy J, Herman C. (1993), Etiology of binge eating: Psychological mechanism. In Fairburn CG. et al., *Binge eating: nature, assessment and treatment*. Guilford Press, New York; pp. 173-205.
- Poncelet, M., Maruani, J., Calassi, R., Soubrie, P., 2003. Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptor deleted mice. *Neurosci Lett* 343 (3), 216-218.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1020-4.
- Rada P, Avena NM, Hoebel BG. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* 2005; 134: 737-44.
- Ramos JA, Gonzalez S, Sagredo O, Gomez-Ruiz M, Fernandez-Ruiz J. Therapeutic potential of the endocannabinoid system in the brain. *Mini Rev Med Chem*. 2005; 5(7): 609-617.
- Rexrode KM e coll.: A prospective study of body mass index, weight change and risk of stroke in women. *JAMA*, 277, 1539-1545, 1997.
- Riedel G, Fadda P, McKillop-Smith S, Pertwee RG, Platt B, Robinson L. Synthetic and plant-derived cannabinoid receptor antagonists show hypophagic properties in fasted and non-fasted mice. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 1154-66.
- Romero J, de Miguel R, García-Palomero E, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA. Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Res*. 1995 Oct 2; 694(1-2):223-32.
- Romero, J., Lastres-Becker, I., de Miguel, R., Berrendero, F., Ramos, J.A. & Fernandez-Ruiz, J. (2002). *Pharm. Ther.* 95, 137-152.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007 Dec;152(7):1092-101.
- Rosenbaum T, Simon SA. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 5.
- Rossetti C, Spena G, Halfon O, Boutrel B. Evidence for a compulsive-like behavior in rats exposed to alternate access to highly preferred palatable food. *Addict Biol*. 2013 May 9.

- Scallet AC. Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;40:671–6.
- Scherma, M., Fattore, L., Satta, V., Businco, F., Pigliacampo, B., Goldberg, S.R., Dessi, C., Fratta, W., Fadda, P., 2013. Pharmacological modulation of the endocannabinoid signalling alters binge-type eating behaviour in female rats. *Br J Pharmacol* 169 (4), 820-833.
- Schienle, A., Schafer, A., Hermann, A., Vaitl, D., 2009. Binge-eating disorder: Reward sensitivity and brain activation to images of food. *Biol Psychiatry* 65 (8), 654-661.
- Scopinho AA, Guimarães FS, Corrêa FM, Resstel LB. Cannabidiol inhibits the hyperphagia induced by cannabinoid-1 or serotonin-1A receptor agonists. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011 Apr;98(2):268-72.
- Sheth SG et al.: Nonalcoholic stea to hepatitis. *Annals of Internal Medicine*, 126, 137-145, 1997.
- Shimizu M and Isogai Y. Heart failure due to metabolic heart disorders. *Nippon Rinsho*, 51, 1362-1366, 1993.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem.* 1995 Feb 24;270(8):3726-31. Erratum in: *J Biol Chem* 1996 Dec 27;271(52):33706.
- Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrie P. SR141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *BehavPharmacol* 1998; 9: 179-81.
- Skibicka KP, Hansson C, Alvarez-Crespo M, Friberg PA, Dickson SL. Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. *Neuroscience.* 2011 Apr 28;180:129-37.
- Smith GP, Gibbs J. The satiety effect of cholecystokinin. Recent progress and current problems. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;448:417-23. Review.
- Soderstrom K., Johnson F. CB1 cannabinoid receptor expression in brain regions associated with zebra finch song control. *Brain Res* 2000; 857: 151–157.
- Soria-Gòmez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, *et al.* 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* 2007; 151: 1109-16.
- South T, Huang XF. Temporal and site-specific brain alterations in CB1 receptor binding in high fat diet-induced obesity in C57Bl/6 mice. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 1288-94.

- Stamler J e coll.: Blood pressure (Systolic and diastolic) and risk of fatal coronary heart disease. *Hypertension*, 13, (5 Suppl.), 12-112, 1989.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*. 1986 Nov-Dec;7(6):1189-92.
- Stefano SC, Bacaltchuk J, Blay SL, Appolinário JC. Antidepressants in short-term treatment of binge eating disorder: systematic review and meta-analysis. *Eat Behav*. 2008 Apr;9(2):129-36. Epub 2007 Mar 28.
- Stunkard, A.J. (1959). Eating Patterns and Obesity. *Psychiatric Quarterly* 33 (2): 284–295.
- Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus*. 2009 Jul;19(7):623-32
- 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(1):89–97.
- Swanson SA, Crow SJ, Le Grange D, Swendsen J, Merikangas KR. Prevalence and correlates of eating disorders in adolescents: Results from the national comorbidity survey replication adolescent supplement. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(7):714–723.
- Teitelbaum P, Stellar E. Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions. *Science*. 1954 Nov 26;120(3126):894-5.
- Timofeeva E, Baraboi ED, Poulin AM, Richard D. Palatable high energy diet decreases the expression of cannabinoid type 1 receptor messenger RNA in specific brain regions in the rat. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 982-92.
- Todisco P, Vinai P. *La fame infinita. Manuale di diagnosi e terapia del disturbo da alimentazione incontrollata*. Torino: Centro Scientifico, 2008.
- Todisco P., Vinai, P. (2009), *La terapia del binge eating disorder*. *Nòos*; 2, 175-185.
- Tramer MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting, quantitative systematic review. *BMJ*. 2001; 323(7303): 16-21.
- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M. C., Mackie K., Walker J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83: 393–411.

- Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 520-3.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996; 379: 69-72.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem.* 1995 Oct 6;270(40): 23823-7.
- Vaidya V: Cognitive behavior therapy of binge eating disorder. *Adv Psychosom Med*, 27, 86-93, 2006.
- Valenti M, Cottone E, Martinez R, De Pedro N, Rubio M, Viveros MP, Franzoni MF, Delgado MJ, Di Marzo V. The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(3):662-72.
- Van der Stelt M e Di Marzo V, (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 480: 133-150.
- Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. Cannabinoids inhibit emesis through CB₁ receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology.* 2001; 121(4): 767-774.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science.* 2005 Oct 14;310(5746):329-32.
- Verty AN, McFarlane JR, McGregor IS, Mallet PE. Evidence for an interaction between CB₁ cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. *Endocrinology* 2004; 145: 3224-31.
- Review of cannabinoids and their antiemetic effectiveness. *Drugs.* 25 (Suppl 1):52-62.
- Verty, A.N., McGregor, I.S., Mallet, P.E., 2005. Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 49 (8), 1101-1109.
- Vinod KY, Hungund BL. Endocannabinoid lipids and mediated system: implications for alcoholism and neuropsychiatric disorders. *Life Sci.* 2005 Aug 19;77(14):1569-83. Review.

- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, Pappas N. "Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse*. 2002 Jun 1;44(3):175-80.
- Walker SP et al.,: Body size and fat distribution as predictors of stroke among US men: *American Journal of Epidemiology*, 144, 1143-1150, 1996.
- Waller G. (2003), The psychology of binge eating. In Fairburn et al., *Eating disorders and Obesity: a comprehensive handbook*. Guilford Press, New York, pp. 98-107.
- Wang, G.J., Geliebter, A., Volkow, N.D., Telang, F.W., Logan, J., Jayne, M.C., Galanti, K., Selig, P.A., Han, H., Zhu, W., Wong, C., Fowler, J.S., 2011. Enhanced striatal dopamine release during food stimulation in binge eating disorder. *Obesity* 19 (8), 1601-1608.
- Welch SP, Stevens DL. Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992 Jul;262(1):10-8.
- Werner NA, Koch JE. Effects of the cannabinoid antagonists AM281 and AM630 on deprivation-induced intake in Lewis rats. *Brain Res*. 2003 Mar 28;967(1-2):290-2.
- Westlake T. M., Howlett A. C., Bonner T. I., Matsuda L. A., Herkenham M. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1994; 63: 637-652.
- Wieseman CV, Gray JJ, Mosimann JE, Ahrens AH. Cultural expectations for thinness in women. An update. *Int J Eat Disord* 1992; 11: 85-9.
- Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, et al. CB(1) cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 293-300.
- Wilfley DE, Wilson GT, Agras WS. The clinical significance of binge eating disorder. *Int J Eat Disord*. 2003;34 Suppl:S96-106. Review.
- Wilfley DE. et al. (2002), A randomized comparison of group cognitive-behavioral therapy and group interpersonal psychotherapy for the treatment of overweight individuals with binge eating disorder. *Arch Gen Psychiatry*; 59, 713-721.
- Williams CM, Rogers PJ, Kirkham TC. Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol Behav* 1998; 65: 343-6.

- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001; 74: 683-701.
- Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 2002; 296: 678–682.
- Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 2001; 410: 588-92.
- Wise RA, Rompre PP. Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* 1989; 40: 191-225.
- Wise RA. Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci* 2009; 32: 517-24.
- Wisniewsky L., Kelly E. (2003), The application of dialectical behavior therapy to the treatment of eating disorders. *Cognitive and Behavioral Practice*; 10, 131-138.
- Wonderlich SA, Joiner TE Jr, Keel PK, Williamson DA, Crosby RD. Eating disorder diagnoses: empirical approaches to classification. *Am Psychol* 2007; 62: 167-80.
- Yang YK, Harmon CM. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. *Obes Rev* 2003; 4: 239-48.
- Yanovski SZ et al.; Food selection and intake of obese women with binge-eating disorder. *American Journal* , 56, 975-980, 1992.
- Yanovski SZ, Sebring NG: Recorded food intake of obese women with binge eating disorder before and after weight loss. *International Journal of Eating Disorders*, 15, 135-150, 1994.
- Zocca JM, Shomaker LB, Tanofsky-Kraff M, Columbo KM, Raciti GR, Brady SM, et al. Links between mothers' and children's disinhibited eating and children's adiposity. *Appetite* Apr 2011;56:324–31.
- Zuardi AW, Finkelfarb E, Bueno OF, Musty RE, Karniol IG. Characteristics of the stimulus produced by the mixture of cannabidiol with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1981 Jan;249(1):137-46.