

## 1. INTRODUZIONE

L'obesità è una condizione caratterizzata da un eccessivo accumulo di tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale (Haslam and James, 2005), dovuta principalmente ad uno prolungato squilibrio tra l'apporto e il dispendio energetico, con un indice di massa corporea (BMI) >30 (Goto et al. 2012 ; Nguyen et al, 2013). L'obesità rappresenta un'epidemia globale che si sta estendendo ad un ritmo allarmante e riguarda ormai tutte le classi socioeconomiche. In tutto il mondo dal 1980 l'obesità si è pressoché raddoppiata e interessa una considerevole fascia della società indipendentemente dall'età. Secondo le ultime indagini statistiche dell'Organizzazione mondiale della sanità, maschi con un BMI >30 rappresentavano circa il 30% della popolazione. In particolare, non solo negli Stati Uniti, ma anche in altri paesi, la prevalenza dell'obesità è ormai superiore al 30%. Inoltre, nel 2008, 1,4 miliardi di adulti (35% in totale), di età superiore a 20, erano in sovrappeso. Di questi oltre 200 milioni di uomini e quasi 300 milioni di donne (11% in totale) risultavano obesi. È interessante notare che il 65% della popolazione mondiale vive in paesi in cui sovrappeso e obesità uccidono più persone di quelle denutrite e sottopeso. Inoltre, più di 40 milioni di bambini sotto i cinque anni risultavano in sovrappeso nel 2011. Le persone obese o in sovrappeso sono spesso vittime di discriminazione (Oka et al., 2010). L'obesità

rappresenta un fenomeno considerato, ormai, un problema sociale e che colpisce più di 600 milioni di persone nei paesi industrializzati. I cambiamenti sociali ed economici, l'urbanizzazione, l'esercizio di attività lavorative sempre più sedentarie, la contrazione del tempo libero, il più delle volte speso in attività di svago che richiedono uno scarso esercizio fisico anche grazie allo sviluppo tecnologico ed alle innovazioni apportate dal comparto informatico e dall'industria hi-tech (Hu, 2003; Hu et al., 2007) così come un maggiore consumo di alimenti ad elevato contenuto calorico, rappresentano le principali cause degli squilibri metabolici che si esprimono in un eccesso di energia immagazzinata nei tessuti con funzione di riserva, che come diretta conseguenza si traduce nell'insorgenza dell'obesità e di processi morbosi ad essa correlati e responsabili della riduzione dell'aspettativa di vita negli individui affetti (Olshansky et al., 2005). L'obesità è per buona parte la conseguenza di stili di vita scorretti come un'alimentazione sregolata e l'eccessiva sedentarietà. Ed essendo alquanto improbabile un sovvertimento di questi stile di vita, per via di precisi modelli socio-economici ben consolidati, a causa delle gravi disfunzioni metaboliche legate all'eccessiva formazione di tessuto adiposo, negli ultimi anni si è assistito ad un forte incremento dell'interesse scientifico volto a comprendere i pathway molecolari che regolano il metabolismo energetico nell'uomo, al fine di

individuare nuovi target farmacologici per prevenire le conseguenze dell'obesità (Schlegel and Stainier, 2007). Tale processo morboso secondo recenti evidenze sembrerebbe responsabile della genesi di uno stato infiammatorio cronico di entità moderata che contribuisce all'insorgenza di disfunzioni metaboliche sistemiche ad esso associate, quasi sempre correlate ad altre patologie quali le disfunzioni cardiocircolatorie, il diabete mellito di tipo 2, l'ipertensione, la dislipidemia, la steatosi epatica non alcolica e i calcoli biliari, le malattie, patologie a carico del sistema osteo-articolare, ictus, sindrome da apnea notturna e alcuni tipi di tumore. che rientrano nel novero delle sindromi metaboliche (Galleano et al, 2012; Oka et al, 2010; Tainaka et al, 2011) e che sono responsabili di una ridotta aspettativa di vita negli individui affetti (Ouchi et al., 2011; Scarpellini and Tack, 2012).

Pertanto l'impellenza di trovare un rimedio efficace e se possibile anche preventivo dell'obesità diventa palese. L'obesità rappresenta un fenomeno di grande attualità e oggi è stata riconosciuta come una patologia multifattoriale. Tale patologia rappresenta anche un problema di tipo economico per la società a causa di un aumento dei costi sanitari e perdita di produttività (Tainaka et al., 2011), quindi l'obiettivo principale delle istituzioni è quello di incentivare e sensibilizzare l'opinione pubblica al fine di ridurre l'incidenza di tale fenomeno.

Sulla base di tali considerazioni l'obiettivo principale della ricerca biomedica in questo campo è quello di comprendere i meccanismi molecolari e cellulari che si trovano alla base della patogenesi dell'obesità, sviluppando e valutando nuove strategie di prevenzione e trattamento. Per tale motivo si rende necessaria un'incentivazione della ricerca biomedica incentrata su un approccio multidisciplinare.

Molteplici sono le ricerche già effettuate su diversi modelli sperimentali ma, ogni modello ha vantaggi e svantaggi che riguardano la cura, i costi, la conduzione di protocolli sperimentali e interpretazione dei risultati. Dai dati presenti in letteratura risulta evidente come modelli murini geneticamente modificati abbiano condotto ad una migliore comprensione delle basi fisiologiche, dei pathway molecolari che sottendono al mantenimento dell'equilibrio energetico, così come dei fattori e delle cause, ambientali, comportamentali, metaboliche e genetiche, che in diversa proporzione contribuiscono e promuovono i meccanismi fisiopatologici responsabili dell'obesità e delle sindromi metaboliche ad essa correlate, consentendo al contempo il raggiungimento di outcomes, che allo stato attuale dell'arte, consentono di approntare delle strategie terapeutiche mirate (target-specifiche) per il trattamento di alcune forme di obesità. (Kanasaki and Koya, 2011).

Studi condotti su roditori hanno dimostrato che il fenotipo obeso può differire in base alle funzioni dei geni KO, al loro background genetico e ai protocolli dietetici (Oka et al, 2010;. Schlegel e Stainier, 2007). Anche se utile e valido, tuttavia il modello murino richiede parecchi fondi, uno staff valido, e un supporto infrastrutturale (Seth et al., 2013). Pertanto, sono stati sviluppati modelli animali di obesità semplici ed economici che vanno ad integrare l'utilizzo dei roditori. Tra questi, lo zebrafish (*Danio rerio*), piccolo pesce d'acqua dolce appartenente alla famiglia Cyprinidae, è recentemente diventato un modello sperimentale molto richiesto per la sua facilità di gestione, per il basso costo e, soprattutto, per le omologie strutturali e funzionali che ha in comune con la specie umana. Recenti studi condotti sullo zebrafish durante l'evoluzione documentano che i circuiti ipotalamici o i segnali neurali ed endocrini che regolano l'omeostasi energetica vengono conservati (Seth et al., 2013; Zhang et al., 2012; Oka et al., 2010; Tainaka et al., 2011).

Al centro del complesso network neuromorale che regola l'omeostasi energetica vi è l'ipotalamo, che controlla lo stato energetico dell'organismo, modulando il delicato equilibrio food intake/dispensio energetico, attraverso l'interpretazione e l'integrazione di tutti quegli input neuronali ed umorali ivi pervenuti da strutture periferiche e/o centrali (Murphy et al., 2006).

L'ipotalamo gioca un ruolo centrale in questa regolazione mediante l'espressione di peptidi oressizzanti e anoressizzanti. Il controllo centrale dell'assunzione di cibo però non è sufficiente da solo a mantenere il delicato equilibrio tra food intake e spesa energetica in maniera stabile. Pertanto, al centro del controllo ormonale superiore arrivano specifici segnali provenienti da due principali sistemi periferici (Schwartz et al., 1999; Mercer e Speakman, 2001). Un sistema periferico a "breve termine", anche chiamato "sistema periferico della sazietà", che trasmette all'ipotalamo segnali relativi alla presenza di cibo nel tratto gastroenterico e di nutrienti nel circolo sistemico; ed un "sistema periferico a lungo termine" che invia all'ipotalamo informazioni sulla quantità e sulla consistenza di tessuto adiposo e, soprattutto, sul bilancio energetico globale dell'organismo.

La maggior parte degli impulsi "a breve termine", veicolati principalmente da ormoni intestinali e segnali neurali provenienti da centri encefalici superiori sembrano essere responsabili della modulazione della rete di informazioni connesse alla sensazione della fame e dello stato di sazietà. Viceversa, gli impulsi "a lungo termine" sembrano essere di natura umorale, come la leptina (ormone secreto dal tessuto adiposo) e l'insulina (ormone pancreatico), il cui ruolo fisiologico è quello di coordinare le risposte

metaboliche, endocrine ed i patterns comportamentali in relazione allo stato endocrino, alle condizioni di salute dell'organismo e alle riserve energetiche in esso presenti. Entrambi poi i segnali "a breve" e a "lungo termine", sembrerebbero in grado di influenzare i pathway metabolici connessi alla spesa energetica, sovvertendo i patterns di secrezione dei centri neuronali ipofisari attraverso stimoli veicolati dalle vie efferenti del sistema nervoso simpatico (Schwartz et al., 2000).

Negli ultimi anni, sono stati effettuati diversi studi al fine di identificare i presunti agenti terapeutici e chemiopreventivi volti a contrastare l'accumulo di grasso e l'assorbimento, aumentare il metabolismo basale, la perdita di peso e il dispendio energetico ed evitare casi patologici, caratterizzati da infiammazione cronica e dallo stress ossidativo. Ridurre il grasso corporeo è un importante obiettivo di benessere in tutto il mondo ed identificare alimenti funzionali che possano contribuire a ridurre il grasso corporeo e soddisfare altre esigenze di salute sono stati oggetto di numerosi studi (Hasler, 2000). Diversi composti naturali sono stati recentemente testati e, tra questi, un ruolo emergente è stato dato agli estratti da frutta e verdura ricchi di polifenoli, in particolare, "flavonoidi" disponibili come integratori alimentari.

## 1.1 Lo zebrafish come modello sperimentale

Lo zebrafish rappresenta ad oggi un modello consolidato per un'ampia gamma di aree di ricerca, dalla biomedicina alla tossicologia (Roush et al., 1996; Bergeron et al., 2008) ed il suo utilizzo per lo sviluppo di processi produttivi in acquacoltura si è rivelato vantaggioso (Ulloa et al., 2011; Ribas & Piferrer, 2013). Lo US National Institute of Health (NIH), ha classificato lo zebrafish come la terza specie più importante per la ricerca, dopo l'uomo e la cavia. Lo zebrafish, largamente allevato in cattività, è una specie tropicale d'acqua dolce che, grazie alla sua versatilità e facilità riproduttiva in ambiente artificiale è, oramai, divenuto il miglior modello sperimentale per le ricerche di biologia dello sviluppo e per l'analisi genica (Bang et al., 2001). Nei primi anni ottanta George Streisinger dimostrò che un semplice trattamento fisico poteva essere usato per produrre cloni omozigoti diploidi di zebrafish (Streisinger et al., 1981). Questo piccolo teleosteo presenta diversi vantaggi: le piccole dimensioni e i bassi costi di gestione rendono lo zebrafish utile per l'attuazione di esperimenti su larga scala che richiedono la complessità di un modello vertebrato e la facilità di manipolazione di un modello invertebrato. Inoltre, poiché l'embrione di zebrafish si sviluppa esternamente ed è trasparente risulta facile un'osservazione non invasiva degli organi e dei processi biologici *in vivo*, con l'ausilio di un



semplice stereomicroscopio. Inoltre, esso matura rapidamente, può essere manipolato geneticamente. In particolare, sono stati condotti studi mirati a migliorare condizioni di mantenimento e sopravvivenza, risposte immunitarie, aspetti nutrizionali e tassi di crescita che si ritiene possano fornire risultati applicabili a specie di importanza commerciale (Oyarbide et al., 2012; Hedrera et al., 2013; Ulloa et al., 2013). Inoltre, lo zebrafish è preferito da un punto di vista etico, ma in termini di complessità biologica, il motivo più importante del suo utilizzo è la somiglianza ad un modello biologico umano (condivide con la specie umana una considerevole quantità di similarità genetiche e fisiologiche) (Seth et al., 2013; Nguyene et al., 2013) e il suo mappaggio genico risulta indispensabile per capire al meglio lo sviluppo e il funzionamento dei vertebrati. In bibliografia sono presenti numerosi dati riguardanti l'espressione genica nello zebrafish, e in particolare, in questi ultimi anni alcuni gruppi di ricerca, tra cui il Wellcome Trust Sanger Institute (UK), stanno cercando di completarne il genoma. Essendo lo zebrafish una delle specie maggiormente studiate, in bibliografia sono presenti dati riguardanti sia lo sviluppo che la morfologia di tutti gli organi, e di conseguenza, sono stati commercializzati un gran numero di anticorpi contro specifiche popolazioni cellulari. Inoltre, in questa specie, sono state numerose le mutazioni genetiche indotte che hanno evidenziato alterazioni nello sviluppo di

cervello, midollo spinale, notocorda, somiti, rene, retina, orecchio, apparato vascolare, apparato scheletrico ed altri organi (Bang et al., 2001).

## **1.2. Zebrafish e obesità**

Vari organismi sono stati recentemente utilizzati non solo per studiare l'ontogenesi e il metabolismo del tessuto adiposo (Schlegel and Stainier, 2007; Flynn et al., 2009; Nguyen et al., 2013), ma anche come modello per le malattie metaboliche come obesità indotta da dieta (Oka et al., 2010; Nguyen et al., 2013; Seth et al. 2013) e obesità genetica (Song and Cone, 2007; Nguyen et al., 2013). Questi modelli animali includono vermi (*Caenorabditis elegans*), mosche (*Drosophila melanogaster*), zebrafish (*Danio rerio*), roditori (topi e ratti) e scimmie Rhesus.

Tra gli organismi modello studiati, lo zebrafish, è ampiamente utilizzato nella ricerca biomedica come modello animale complementare per diverse patologie umane sia in età precoce che adulta (Lieschke and Currie, 2007; Nguyen et al., 2013), così come per le alterazioni riguardanti il food intake e l'utilizzo dell'energia (Seth et al., 2013). Infatti, esso, pur non potendo rimpiazzare i modelli rappresentati dai roditori, può aiutare a far luce su aspetti dei disordini comportamentali e metabolici in maniera trasversale (Nguyen et al., 2013). Diversamente dai roditori, lo zebrafish è poichilotermo, quindi supera

l'inconveniente della mancanza di termoneutralità che i roditori subiscono nella stabulazione. Infatti, la temperatura corporea dei roditori è circa 37°C mentre la stabulazione viene mantenuta a 20°C e ciò risulta particolarmente importante per gli studi sperimentali che esaminano gli endpoint connessi al metabolismo (Seth et al., 2013).

Da un punto di vista morfologico, lo zebrafish conserva bene l'organizzazione di organi e tessuti comuni con i mammiferi, incluso il tratto gastroenterico (Harper and Lawrence, 2010; Wang et al., 2010). Per tali ragioni, nel corso dell'ultimo decennio, numerose patologie gastrointestinali sono state studiate sul modello zebrafish (Goldsmith and Jobin, 2012).

Inoltre, sono stati creati modelli di obesità genetica e indotta dalla dieta (Song and Cone, 2007; Holtta-Vuori et al., 2010; Oka et al., 2010; Chu et al., 2012; McMenamin et al., 2013). Tali modelli hanno mostrato la presenza di una stretta correlazione con la fisiopatologia dell'obesità indotta da dieta nell'essere umano, suggerendo l'utilità di sfruttare lo zebrafish come modello per lo studio dell'obesità e delle patologie associate (Oka et al., 2010; Nguyen et al., 2013). Nel 2010 Oka e collaboratori hanno validato lo zebrafish come modello sperimentale, per l'analisi dell'obesità indotta dalla dieta (D.I.O. = diet-induced obesity) ed hanno dimostrato che sovralimentare gli zebrafish con nauplii di

Artemia appena schiusi permette di sviluppare un modello semplice e poco costoso di obesità che condivide pathway fisiopatologici comuni con l'obesità nei Mammiferi. La sovralimentazione dello zebrafish conduce ad un accumulo di grasso bianco negli stessi compartimenti di deposito dell'essere umano (Oka et al., 2010; Mcmenamin et al., 2013). Pertanto lo zebrafish è stato utilizzato per indagare parametri metabolici quali: peso corporeo, adiposità e dispendio energetico (Farber et al., 2001; Jones et al., 2008; Flynn et al., 2009; Oka et al., 2010; Anderson et al., 2011).

### **1.3 Neuropeptidi coinvolti nel controllo dell'appetito**

Negli ultimi anni è andato accrescendosi l'interesse per la comprensione degli intimi meccanismi che presiedono al controllo del food intake ed al mantenimento dell'omeostasi energetica nei Mammiferi, e del complesso sistema di interazioni che correlano il SNC e la periferia (tessuto adiposo e apparato gastroenterico).

I meccanismi che presiedono l'omeostasi energetica vedono partecipare ed interagire all'interno di una complessa rete di comunicazione diverse strutture, tra cui organi periferici come il tessuto adiposo bianco, l'apparato gastroenterico, il pancreas ed il sistema nervoso centrale che processa ed integra

a livello di specifiche stazioni nervose i segnali meccanici, chimici e neuroumorali ad esso pervenuti per via ematica ed attraverso fibre nervose afferenti simpatiche e vagali (Berthoud, 2012). Tra i nuclei encefalici, il nucleo del tratto solitario (NTS) riceve e processa la maggior parte degli input nervosi provenienti dall'intestino, veicolati dalle fibre vagali, che proiettano le informazioni da esso integrate ai centri nervosi superiori coinvolti nel controllo dell'appetito e come precedentemente detto, situati nell'ipotalamo. Tuttavia sebbene i sistemi di conduzione vagali giochino un ruolo preponderante nel trasportare le informazioni relative alla presenza di nutrienti nel tubo digerente, anche una lunga lista di ormoni e peptidi sono coinvolti nella regolazione dell'equilibrio energetico, trasmettendo a specifiche popolazioni neuronali le informazioni relative allo stato nutrizionale e metabolico dell'organismo (Sohn et al., 2013).

I neuropeptidi coinvolti nel controllo dell'assunzione di cibo possono essere distinti, in base alla azione stimolante od inibente l'appetito, in orezzizzanti (o anabolici) ed anoressizzanti (o catabolici). Tra i primi è possibile annoverare: Orexina A e Orexina-B, Grelina, Neuropeptide Y (NPY), Melanin-concentrating hormone (MCH). I principali neuropeptidi ad azione anoressizzante sono: Leptina, Alpha-melanocyte-stimulating hormone (-MSH), Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), Corticotropin-releasing factor (CRF) e

Serotonina (5-HT). In particolare, la scoperta della funzione endocrina svolta dal tessuto adiposo, non meno di un ventennio fa ritenuto mero organo di stoccaggio delle riserve energetiche, ha ampliato i possibili outcomes scientifici ed i campi di ricerca volti ad approfondire e chiarire i processi di sintesi, storage, secrezione così come i meccanismi d'azione, i siti d'azione e gli effetti mediati da tali molecole bioattive. Proprio come organo a funzione endocrina, il tessuto adiposo si è infatti rivelato di fondamentale importanza nel mantenimento dell'omeostasi metabolica adattando i pattern di secrezione di leptina, adiponectina, NEFA (acidi grassi non esterificati) ed altre adipochine in risposta alle esigenze organiche di un bilancio energetico positivo o negativo ed in funzione alle condizioni di digiuno o durante e dopo i pasti a seconda del flusso di nutrienti (Halberg et al., 2005; Stern et al., 2016).

### **1.3.1 Leptina**

La leptina, un peptide citochina-simile, è stata clonata per la prima volta nei topi *ob/ob* nel 1994 (Zhang et al., 1994), come fattore responsabile dell'obesità morbosa dei topi mutanti *ob/ob*.

Il gene della leptina è altamente conservato tra le varie specie di Mammiferi (Ahima e Osei, 2004) mentre l'omologia tra la leptina dei Mammiferi

e quella dei Teleostei e all'interno del gruppo dei Teleostei è molto bassa (Murashita et al., 2008).

Studi condotti da Johnson e collaboratori (2000) hanno documentato una proteina immunoreattiva alla leptina nei pesci. Successivamente è stata coniugata la leptina dal *Fugu*, dimostrando che la struttura primaria della leptina è identica alla leptina umana solo per il 13% (Kurokawa et al. 2005). In seguito ulteriori studi hanno dimostrato che le strutture terziarie delle leptine dei pesci sono molto simili a quelle delle leptine dei Mammiferi (Huising et al., 2006; Gorissen et al., 2009). La leptina agisce attraverso i recettori (proteine Ob-R), localizzate nella membrana plasmatica. In accordo alla lunghezza del dominio intracellulare, le proteine Ob-R si dividono in un'isoforma lunga (Ob-Rb) e quattro isoforme corte (Ob-Ra, c, d, f) (Cinti et al., 2001). Oltre a queste, esiste anche un'isoforma solubile (Ob-Re), che manca del dominio transmembrana e può essere coinvolta nel trasporto della leptina nel sangue. Recentemente, è stato riportato che nello zebrafish la forma lunga del recettore presenta circa il 20% di identità della sequenza primaria rispetto ad altri vertebrati ed è per lo più simile a quella di altri pesci (32%) (Liu et al., 2010). Inoltre, è stato dimostrato che alcune regioni della sequenza all'interno dell'ipotetico sito di legame della leptina sono altamente conservate (Kurokawa et al., 2005; 2008).

Al di là dei report iniziali, la leptina non è sintetizzata solo dal tessuto adiposo, ma anche dal tratto digestivo, così come riportato nei Mammiferi (Sobhani et al., 2000; Cinti et al., 2001; Russo et al., 2012), negli Uccelli (Doyon et al., 2001) e nei Pesci (Russo et al., 2011; Donald et al., 2011). L'espressione di questa proteina è stata trovata anche in molti altri tessuti come la placenta (Masuzaki et al., 1997), il muscolo scheletrico (Wang et al., 1998), e l'epitelio dei Mammiferi (Casabiell et al., 1997), estendendo il ruolo della leptina a molte altre funzioni biologiche (Sanchez et al., 2005).

Relativamente ai Mammiferi, poco si sa circa l'omeostasi energetica nei pesci ma, così come in tutti i Vertebrati, la regolazione dell'appetito e del peso corporeo è un fenomeno complesso che implica elaborate interazioni tra il cervello e i segnali periferici. Nel cervello, in particolare, il nucleo arcuato dell'ipotalamo (ARC) gioca un ruolo centrale in questa regolazione, mediante l'espressione di peptidi oressizzanti e anoressizzanti. La leptina agisce sui neuroni della pro-opiomelanocortina (POMC)/Trascritto regolato dalla cocaina e dall'amfetamina (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART)) dell'ARC per aumentare la biosintesi della POMC (e del CART) che genera un segnale anoressizzante attraverso l'ormone alfa stimolante i melanociti (alpha melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)) (Elias et al., 1999; Bates et al., 2003).



E' noto che la Leptina nei Mammiferi, secreta principalmente nel flusso sanguigno dagli adipociti, agisce sul cervello per regolare il food intake e il metabolismo (Zhang et al., 1994; Pelleymounter et al., 1995). Le azioni della leptina hanno luogo sia a breve che a lungo termine. Nel breve termine, la leptina plasmatica serve da segnale di sazietà (Ahima, 2005) e in periodi più lunghi la concentrazione media giornaliera di leptina plasmatica comunica al cervello lo stato energetico dell'organismo a lungo termine (Chehab et al., 1997).

### **1.3.2 POMC**

E' il gene che codifica la proteina precursore POMC, che viene ulteriormente clivato in modo tessuto-specifico per produrre tutti i componenti del sistema melanocortinico (AgRP, alpha-MSH, beta MSH, gamma-MSH, MCH e i loro recettori MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R) (Yeo and Heisler, 2012). POMC é principalmente rilevato nell'ipotalamo e nell'ipofisi: in particolare, nell'ipotalamo un tono endogeno POMC è mantenuto attraverso una costitutiva attivazione di MC4R nell'ipotalamo (Cone, 1999). Gli effetti inibitori nell'assunzione di cibo sono esercitati attraverso un incremento post-pandriale dell'espressione di Pomc e/o espressione del MC4r (Pritchard et al., 2002). Nei topi l'ablazione dei neuroni del POMC nell'ipotalamo causa obesità progressiva( accompagnata da una decrescita dell'assunzione di cibo, riduzione della spesa energetica e una

maggiore ansia comportamentale). Inoltre, una riduzione dell'espressione ipotalamica di AgRP e del recettore della Grelina sono associati ad un marcato deficit endocrino (Nguyen et al., 2013). Negli zebrafish, le proteine del sistema melanocortinico (POMC, agRP, alpha-MSH, beta MSH, gamma-MSH, MCH e i loro recettori) sono espresse nell'ipotalmo e nell'ipofisi e rispondono alla leptina, come nei mammiferi (Seth et al., 2013; Holtta-Vuori et al., 2010). Infatti lo zebrafish possiede due coppie di geni POMC (a e b con 43,5% e 37% come nel POMC dei mammiferi), rispettivamente derivante da un completo evento di duplicazione del genoma che segue l'evoluzione dei vertebrati terrestri (Gonzales-Nunez et al., 2003; Cerdà-Reverter et al., 2011).

Studi recenti in zebrafish suggeriscono anche la subfunzionalità dell'azione di condivisione ancestrale del POMC con il nuovo gene paralogo nei pesci teleostei (Cerdà-Reverter et al., 2011). Il sistema melanocortinico esercita un ruolo inibitore nell'alimentazione attraverso un'attivazione costitutiva del MC4R centrale, regolata da un legame di AgRP nell'area tuberale e preottica dell'ipotalamo (Cerdà-Reverter et al., 2011). Il legame degli agonisti può aumentare il tono melanocortinico sotto particolari condizioni fisiologiche. A supporto di queste ipotesi è stato visto che la sovraespressione di AgRP in zebrafish si traduce in un aumento della crescita lineare e del peso corporeo

totale, ipertrofia degli adipociti viscerali e incremento dei livelli totali di trigliceridi, suggerendo che questi pesci sono obesi (Song and Cone, 2007).

### **1.3.3 Grelina**

La grelina, caratterizzata per la prima volta nei mammiferi nel 1999 da Kojima, è un ormone oressizzante che agisce come antagonista della leptina nel cosiddetto “ghrelin-leptin tango” sia a livello gastrico che centrale (Varricchio et al., 2012). Lo stomaco è il principale sito di sintesi della grelina sebbene l'intero tratto gastroenterico e il cervello rappresentino potenziali siti per la produzione di tale sostanza nei vertebrati. I recettori per la grelina sono presenti nell'ipotalamo, dove si pensa che essa agisca (Varricchio et al., 2012). La grelina agisce a breve termine aumentando rapidamente prima del pasto e diminuendo rapidamente dopo di esso in coincidenza con il picco della leptina per regolare i livelli di glucagone e insulina (Nguyen et al., 2013). Il “ghrelin-leptin tango” agisce a livello centrale per regolare in maniera differenziata l'espressione dei fattori oressizzanti ed anoressizzanti nel nucleo arcuato dell'ipotalamo. A livello gastrico, il “ghrelin-leptin tango” si manifesta con la repressione della leptina e l'espressione della grelina attraverso gli specifici recettori della mucosa gastrica (Varricchio et al., 2012).

La grelina, inoltre, media nei roditori la risposta allo stress stimolando l'asse ipotalamo-ipofisi (Nguyen et al., 2013). I livelli circolanti di grelina pare aumentino l'appetito e l'ormone della crescita (GH) anche nei pesci, spingendo il metabolismo generale verso i processi anabolici (Varricchio et al., 2012).

La grelina nei pesci mostra una struttura primaria altamente conservata (Amole e Unniappan, 2009). Inoltre, la grelina regola varie funzioni biologiche in vertebrati non mammiferi in maniera specie-specifica (Amole e Unniappan, 2009; Unniappan et al., 2004). In particolare, il digiuno induce un aumento nell'espressione dell'mRNA preprogreline nel cervello e nell'intestino dello zebrafish se rapportato all'espressione che si registra nell'alimentazione ad libitum dei pesci, ed essa decresce seguendo un refeeding dopo 7 giorni di digiuno suggerendo un ruolo oressizzante per la grelina nei teleostei (Amole and Unniappan, 2009). Due recettori per la grelina sono stati identificati nello zebrafish, GHS-R1 e GSH-R2 (Kaiya et al., 2008; Olsson et al., 2008) e l'immunoreattività per la grelina e il recettore (usando anticorpi di trota arcobaleno) è stata ricercata nell'intestino (Olsson et al., 2008), questo a supporto di un possibile ruolo nell'influenzare la motilità intestinale, presumibilmente accoppiato con il rilascio di grelina da qualche altra parte del corpo del pesce (es. sistema nervoso centrale, stomaco) (Olsson et al., 2008).

#### **1.3.4 Orexina**

Le orexine A e B anche conosciute come ipocretina A e B sono neuropeptidi ipotalamici derivanti da un precursore a 130 aminoacidi la pro pre-orexina. L'orexina A è un peptide a 33 aminoacidi, l'orexina B è un peptide a 28 aminoacidi. Isolate per la prima volta dall'ipotalamo di ratto (Sakurai et al 1981, de Lecea et al 1998), vengono sintetizzate, soprattutto, ma non esclusivamente, dai neuroni con soma localizzato a livello dell'ipotalamo laterale. Entrambi i peptidi agiscono per mezzo di due recettori specifici OX1R e OX2R. L'orexina 1R (OX1R) èlettivo per l'orexina A e l'orexina 2R (OX2R) èlettivo per entrambe (Ammons et al., 2003). Le orexine sono altamente conservate nei mammiferi, compresi roditori e uomo. Inizialmente si pensava che la loro azione fosse limitata al controllo dell'assunzione del cibo, del ritmo sonno veglia e del bilanciamento energetico (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Oltre alla localizzazione nell'ipotalamo laterale, in cui furono inizialmente descritte, le orexine ed i relativi recettori sono state evidenziate in corpi neuronali e fibre positive presenti in diverse regioni del sistema nervoso centrale (SNC). La loro localizzazione fu, ovviamente, messa in relazione con le funzioni svolte e con i nuclei e le vie nervose in cui vennero evidenziate. Mediante tecniche di immunistochemica (IHC) e di ibridazione in situ neuroni positivi all'OXA sono

stati descritti nel nucleo perifornicale e in quello ipotalamico dorsomediale e fibre positive nel bulbo olfattorio, nella corteccia cerebrale, nel talamo, nell'ipotalamo e nel midollo spinale di ratto. Inoltre, neuroni immunoreattivi all'OX1R sono stati descritti nelle porzioni dorsomediale e ventromediale dell'ipotalamo e nel nucleo soprachiasmatico, mentre neuroni immunoreattivi all'OX2R sono stati osservati nell'ipotalamo laterale e nei nuclei arcuato e tubercolo-mammillare (Kirchgessner, 2002). I neuroni orexinergici presentano forma diversa, sferica, fusiforme e multipolare e dimensioni variabili dai 14 ai 40  $\mu\text{m}$  (Kukkonen et al., 2002). La diffusa distribuzione dell'mRNA che codifica per le due orexine nel cervello suggerisce che tali peptidi siano coinvolti in differenti vie funzionali come il controllo da parte del cervello sulla ghiandola pituitaria.

### **1.3.5 NPY**

Scoperto in primo luogo nel cervello di maiale (Tatemoto et al., 1992) il neuropeptide Y è sintetizzato e co-rilasciato nei neuroni NPY/AgRP nell'ipotalamo. Ma NPY e AgRP esercitano effetti oressizanti nell'assunzione di cibo; in particolare, NPY è l'ormone oressizante più importante a livello centrale e rallenta il metabolismo (Zhang et al., 2014; Nguyen et al 2013). E' anche un importante regolatore di stress, ansietà e soprattutto obesità sia nell'uomo che nei roditori, specialmente, se associati a una dieta ricca di grassi (Nguyen et al.,

2013). Agisce attraverso i recettori Y1,Y2,Y3,Y4,Y5 e Y6; tra loro il recettore responsabile dell'effetto oressizante sembra essere il Y5 (Neglia et al., 2007).

La funzione di NPY è determinata dal sito-specifico NPY e dal recettore di espressione sottotipo NPY, dal rilascio di NPY, degradazione, e concentrazione nel sangue, molte delle quali sono regolate da numerose strategie di bilancio energetico; esso è anche coinvolto in altri processi fisiologici come la locomozione, apprendimento e memoria, ansietà, epilessia, ritmi circadiani e funzioni cardiovascolari. (Zhang et al., 2014). Queste ipotesi sono dimostrate dal fatto che la soppressione dell'espressione di NPY nell'ipotalamo dorsomediale, promuove lo sviluppo degli adipociti bruni e previene l'obesità indotta con la dieta (Chao et al., 2011) e che l'applicazione di NPY e AgRP al terzo ventricolo facilita l'assunzione di cibo (Zhang et al., 2014). I pesci esprimono tre NPY correlati ai peptidi: NPY peptideYY (PYY), e peptide y (PY). Il NPY peptide o la sequenza cDNA sono state determinate per parecchie specie, incluso lo zebrafish (Volkoff, 2006). mRNA di NPY è maggiormente espresso nel cervello dei pesci ma può essere anche rilevato nei reni (Volkoff, 2006). Fibre NPY-immunoreattive sono state evidenziate anche a carico dell'ipofisi e negli intestini (Cerdà-Reverter and Larhammar, 2000). Entrambi i Recettori Y1 e Y2 sono stati identificati nei pesci; essi sono espressi nel cervello e nel tessuto

periferico incluso il tratto GI( Larsson et al., Fredriksson et al., 2004; Larhmmar et al., 2001). NPY regola l'alimentazione dei pesci, infatti iniezioni sperimentali di NPY di mammifero o di pesce a livello centrale o periferico aumenta il food intake del pesce rosso in maniera dose dipendente. I recettori Y1 e Y5 sono assenti nello zebrafish, questo suggerisce che i due geni dei recettori possono essere stati persi in alcuni pesci e qualche altro sottotipo di recettori NPY possa andare a mediare l'azione del NPY nell'assunzione di cibo (Larsson et al., 2005., Larhmmar and Salaneck, 2004). Il digiuno o l'ingestione di un pasto induce cambiamenti nell'espressione di mRNA di NPY, Orexina e Cart. Suggestiscono che lo stato di nutrizione e la composizione dei nutrienti modula l'azione di questo sistema (Volkoff 2006). Tuttavia sia nei pesci che nei mammiferi, NPY e orexina hanno azione sinergica nell'assunzione di cibo e sono modulati entrambi dalla proteina CART. Il Sistema NPY è anche influenzato da fattori endocrini della periferia, compresa la leptina e altri ormoni dell'intestino e del pancreas (Volkoff., 2006).



#### **1.4 Flavoidi e obesità**

Nei paesi industrializzati, l'obesità rappresenta una vera e propria emergenza sanitaria avente enormi ripercussioni sia sulla salute pubblica che sulla spesa sanitaria. Per far fronte all'allarmante incremento dell'incidenza di tale patologia, negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è sempre più concentrata sull'esigenza di studiare cibi cosiddetti "funzionali" che potessero contribuire a ridurre il tessuto adiposo a livello corporeo (Hasler, 2000). Tra questi grande importanza hanno assunto di recente delle particolari sostanze di origine vegetale dette *flavonoidi*.

I flavonoidi sono dei composti polifenolici naturalmente presenti in diverse specie vegetali, in particolare a livello di semi e buccia. In natura agiscono soprattutto come cromofori, antiossidanti, antimicrobici e come agenti di attrazione o repulsione nei confronti degli animali. Da un punto di vista chimico, i flavonoidi rappresentano un ampio e complesso gruppo di composti polifenolici derivati del fenil- $\gamma$ -benzopirone. Molti flavonoidi assorbono luce visibile; in natura questi composti conferiscono a fiori e frutti una colorazione giallo-arancione, rossa, violetta ed azzurra. La colorazione azzurro-violacea è propria degli antociani, pigmenti presenti in fiori e frutti. Gli antociani sono derivati dei flavonoidi nei quali il nucleo g-pironico è sostituito dallo ione pirossonio, carico

positivamente. La tonalità gialla dipende dal numero di ossidrili legati ai nuclei benzenici del nucleo flavonico (nelle posizioni 5, 7, 2', 3' e 4'); l'intensità del colore è tanto maggiore quanto più elevato è il numero di gruppi -OH presenti. I glicosidi sono solubili in acqua ed insolubili in solventi organici; al contrario le genine sono poco solubili in acqua e solubili in etere. Tali composti hanno mostrato di avere numerose capacità a livello dell'organismo essendo sostanze biologicamente attive. Essi, infatti, hanno dimostrato di avere funzioni farmacologiche, antimicrobiche, biologiche e antiossidanti (Pandey and Rizvi, 2009; Rathee et al., 2009). In particolare, diverse ricerche hanno messo in luce le capacità anti obesità degli estratti di alcuni tipi di agrumi aventi importanti effetti sulla  $\beta$ -ossidazione e sull'aumento della lipolisi in soggetti obesi ( Jung et al., 2011; Tsujita and Takaku, 2007; Bok et al., 1999; Kang et al., 2012). Inoltre, studi recenti sull'estratto di bergamotto hanno confermato gli effetti sulla lipolisi e focalizzato l'attenzione sulla sua capacità di ridurre la lipogenesi (Lo Furno et al., 2016).

Negli ultimi anni studi effettuati su estratti di semi d'uva (*Vitis vinifera*) ne hanno mostrato la grande versatilità e utilità e hanno mostrato benefici effetti anche sull'obesità indotta da dieta su modelli murini (Park et al, 2008).

#### **1.4.1 *Vitis vinifera***

La vite comune (*Vitis vinifera* L., 1753), è un arbusto rampicante della famiglia Vitaceae, largamente coltivata principalmente per la produzione del vino e dell'uva da tavola. L'uva, uno dei frutti più comunemente consumati nel mondo ha varie funzioni biologiche, per le sue componenti ricche di polifenoli, la maggior parte delle quali sono contenute nei semi (60-70%) e nella buccia (30%). Grandi quantità di prodotti di scarto dei semi di uva vengono prodotte ogni anno dall'industria alimentare che li trasforma per produrre vino, succhi di frutta ecc (Yoo et al., 2004). Gli ingredienti dell'uva hanno anche proprietà salutari. I bioflavonoidi fenolici estratti dai semi e dalla buccia dell'uva sono potenti antiossidanti. Catechina, epicatechina ed epicatechina gallato, e acido gallico sono i composti monomerici identificati nei semi d'uva. Questi insieme a dimeri, trimeri e oligomeri della catechina e della epicatechina sono indicati come procianidine (Yilmaz & Toledo, 2004). Quando vengono utilizzate o con la vitamina C o con la vitamina E, l'estratto possiede il doppio della capacità antiossidante (Shi et al., 2003). I polifenoli nei semi d'uva sono stati anche segnalati per avere un'ampia varietà di attività biologiche, tra cui gli effetti antiossidanti (Bagchi et al., 2000) e antitumorali (Bomser et al., 1999; Agarwal et al., 2000), nell'abbassamento dei livelli lipemici (Moreno et al., 2003) e per la prevenzione

dell'aterosclerosi, delle patologie cardiovascolari e dello sviluppo di radicali liberi (Curin et al., 2006). Sono stati molto studiati, inoltre, gli effetti neuroprotettivi di tali composti (De Freitas and Glories, 1999; Zhang et al., 2005; Pfeiffer et al., 2006; Charradi et al., 2012).

In particolare, studi condotti sui polifenoli da essa derivanti, hanno dimostrato un importante effetto sui valori di pressione sanguigna e sui livelli di glucosio ematico, lipidi, trigliceridi e colesterolo (Ford et al., 2002), nonché un'azione protettiva su cuore e fegato facendone una possibile candidata nella gestione della sindrome metabolica (Park et al., 2008). La supplementazione dietetica con estratti di bucce di uva ha, inoltre, dimostrato una valida azione anti-iperlicemizzante nel coadiuvare il controllo dei livelli di glicemia e dei fenomeni infiammatori in modelli sperimentali presentati obesità dieta-indotta dalla dieta (Hogan et. Al, 2011).

## 2. OBIETTIVI

Malgrado negli ultimi anni numerosi siano i dati presenti in letteratura riguardanti gli effetti dei flavonoidi sull'obesità e sulle malattie ad essa associate, ad oggi molte questioni rimangono ancora irrisolte. Pertanto, lo scopo di tale studio è stato quello di chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari e fisiologici attraverso i quali un trattamento con flavonoidi, derivati dal frutto di *Vitis vinifera*, potrebbe agire. A tal fine, è stato utilizzato un protocollo sperimentale volto ad esaminare in maniera approfondita gli effetti del trattamento dell'estratto d'uva (*Vitis vinifera*) in condizioni normali e di obesità indotta dalla dieta nello zebrafish attraverso uno studio morfologico e molecolare. Questo lavoro potrebbe contribuire ad ampliare la conoscenza reale sul potenziale uso dei flavonoidi come trattamento dell'obesità e dei disturbi correlati.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Prassi di legge relativa alla sperimentazione animale**

La stabulazione e l'uso degli animali per tale progetto seguono le linee guida sulla manipolazione e le pratiche relative agli animali da laboratorio, approvate dalla Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). L'intero protocollo sperimentale segue i principi enunciati nella Dichiarazione di Helsinki e la legislazione sulla sperimentazione animale (Decreto Legislativo 116/92) in attuazione delle direttive 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici. Inoltre, la sperimentazione è stata approvata dal Ministero della Sanità con comunicazione 8-07-2013 prot n. 50.

#### **3.2 Zebrafish breeding**

Nella presente ricerca sono stati utilizzati zebrafish provenienti dal Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (C.I.S.S.) sito presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina.

I soggetti utilizzati sono stati allevati in un acquario di acqua dolce a temperatura costante di 28°C, con pH compreso tra 6-7, in condizioni ottimali di ossigenazione e con fotoperiodo naturale e verificando l'assenza di eventuali rumori e fattori di stress per gli animali.

Per la sperimentazione sono stati separati i maschi dalle femmine in base al dimorfismo sessuale in modo da scegliere solamente i maschi. Non sono state utilizzate le femmine poiché nei periodi di riproduzione le uova altererebbero il reale peso dell'animale inficiando notevolmente i risultati dell'esperimento. Gli zebrafish maschi sono stati stabulati separatamente in vasche da un litro ponendo uno zebrafish per 1l di acqua secondo il protocollo di Oka e collaboratori (2010).

Per assicurarsi che venisse somministrata la giusta dose di flavonoidi, l'estratto di Vitis è stato incorporato all'interno di un mangime commerciale artificiale ad alto contenuto proteico e vitaminico in modo da poter garantire lo stesso tipo di alimento sia al controllo che all'obeso.

### **3.3 Modello sperimentale di zebrafish obeso D.I.O (Diet Induced Obesity) e trattato con flavonoidi**

Come precedentemente dimostrato (Oka et al.2010), l'ottenimento di un modello obeso si può avere triplicando la dose giornaliera di alimento vivo (60mg/cisti/pesce/die di nauplii di artemia appena schiusi) e somministrandola in tre pasti; pertanto, seguendo, e modificando il protocollo di Oka, per il raggiungimento del modello obeso sono stati somministrati 2 pasti con artemia

(40mg/cisti/pesce/die di nauplii di artemia appena schiusi) e un pasto con mangime. Questa modifica è stata fatta per poter somministrare al gruppo obeso da trattare il mangime contenente il flavonoide (l'estratto di Vitis) utilizzando lo stesso protocollo sopradescritto. In tal modo per la prima volta abbiamo ottenuto un modello obeso con una doppia alimentazione avendo lo stesso risultato precedentemente dimostrato da Oka e collaboratori.

I pesci sono stati divisi in quattro gruppi (n=10 pesci per gruppo) sottoposti a differenti regimi alimentari. Il primo gruppo overfeed (OF) è stato sovralimentato per favorire il raggiungimento del modello obeso con tre pasti giornalieri (ore 7:00, 12:00, 17:00) di cui uno costituito da 50 mg mangime/pesce/die e i restanti due effettuati con la somministrazione di 40mg cisti/pesce/die di nauplii di Artemia appena schiusi per rendere più appetibili i pasti. Il secondo gruppo (OF+VITIS) è stato sovralimentato anch'esso con tre pasti giornalieri costituiti da 50 mg mangime/pesce/die ma con l'aggiunta di flavonoidi e, sempre per il raggiungimento del modello obeso, è stato, inoltre, alimentato con 2 somministrazioni giornaliere di 40mg cisti/pesce/die di nauplii di Artemia appena schiusi.

Il terzo gruppo (CTRL) è stato alimentato con il corrispettivo di 50 mg mangime/pesce/die.



Il quarto gruppo (CTRL+VITIS) è stato alimentato con il corrispettivo di 50 mg mangime/pesce/die addizionato con flavonoidi.

L'intero protocollo sperimentale è durato 4 settimane. L'acqua è stata cambiata ogni giorno per evitare ai pesci stress ambientali causati da eccesso di materia organica nelle vasche e conseguenti patologie che avrebbero potuto influire sul lavoro.

Giornalmente sono stati osservati atteggiamenti comportamentali come la valutazione del mantenimento del gruppo, l'assunzione di cibo e la reattività a stimoli esterni, atti a valutare il benessere animale.

#### **3.4 Misura dell'indice di massa corporea (BMI) e processazione dei campioni**

Durante il trattamento, al fine di analizzare l'incremento dei livelli di BMI, sono state misurate settimanalmente la lunghezza (espressa in cm) e il peso corporeo (espresso in g) di ogni pesce.

La lunghezza è stata misurata dall'estremità della bocca alla fine della coda, mentre il peso corporeo è stato misurato con una bilancia analitica di precisione. Successivamente, le misure di BMI sono state normalizzate dividendo ciascun valore di BMI per il primo valore riportato per ciascun gruppo.

### **3.5 Trattamento del tessuto**

Dopo 4 settimane di trattamento, i pesci sono stati tenuti a digiuno per 72 ore e anestetizzati con MS222 (ethyl 3-aminobenzoato metansulfonato, 0.2 g/l; Sigma, Saint Louis, MO, USA). Per ogni gruppo, costituito da 10 zebrafish, sono stati processati cinque soggetti per la PCR e cinque per la microscopia ottica e lo studio morfometrico.

### **3.6 qRt-PCR**

Gli intestini utilizzati per la PCR sono stati isolati e raccolti in base ai gruppi sperimentali.

L'isolamento del RNA e la trascrizione inversa per la qRt-PCR e l'RNAs totale sono stati estratti da intestini appena campionati usando il reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

L'integrità dell' RNA è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel agarosio. L'RNA estratto è stato retroscritto in una quantità di 20 microlitri, utilizzando 20U di Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg,MD) in un tampone contenente 2 microgrammi di RNA, 5 micromoli di oligo (dT) 12-18, mM dNTPS, 40U di RNA-ase inhibitor (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont,

Buckinghamshire, UK), 0.1 microgrammi/miscrolitri BSA e 10 mM DTT. La reazione è avvenuta a 42°C per 90 minuti.

Le sequenze dei primers oligonucleotidici sono state basate sulle sequenze rivelate per il Leptina B, Grelina, Orexina, PMOC, NPY, e  $\beta$ -actina di *Danio rerio* (GenBank accession number NM\_001128576; GenBank accession number EU908735.1; GenBank accession number NM\_001077392,2; GenBank accession number AY125332.2; GenBank accession number BC162071; GenBank accession number NM\_131031). I primers utilizzati per la Leptina B erano in sense: 5'GATGAGCACTTCCAGATGTC-3', e in reverse: 5'TGTCTATGTTGAGGCAGAGC-3'; per la Grelina in sense: 5'CAAGAGTGGGCAGAAGAGAA-3', reverse: 5'CTGAAGCACGGGACCATATT-3'; per l'Orexina erano in sense: 5'GCTCCTTGCAAACACTACGAG-3', e in reverse: 5'GAGTTGTGCAGCAGCAGTTG-3'; per il PMOC erano in sense: 5'TGAACAGATAGAGCCGGAGT-3', e in reverse: 5'ACCTCGTTATTTGCCAGTC-3'; per l'NPY erano in sense: 5'TGAAGATGTGGATGAGCTGG-3', e in reverse: 5'CACCATGCCAAATGATCCTC-3'; per la  $\beta$ -actina erano in sense: 5'TTGCCCCGAGGCTCTCTT-3', e in reverse: 5'AGTTGAAGGTGGTCTCGTGGAT-3'

Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 2U Taq DNAPolymerase (Promega, Madison, WI), 1 micromoli di primers, 10ng di cDNA di cervello di

zebrafish, 0.2mM di dNTP in 15 microlitri di buffer taq DNA Polymerase.

La reazione è stata eseguita in un termociclatore (Hyband Th. Cycler) con il seguente ordine: 1 min a 94°C per la denaturazione iniziale, poi 10 cicli a 94°C per 1 min, a 65°C per 30 secondi e a 72°C per 45 secondi, quindi altri 20 cicli a 94°C per 1 min, a 61°C per 30 secondi, 72°C per 45 secondi e infine a 72°C per 5 minuti.

I risultati della PCR sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel agarosio al 2% mediante impiego di bromuro di etidio.

### **3.7 Morfologia e studio morfometrico: analisi degli adipociti dello zebrafish**

Lo studio morfologico degli adipociti è stato condotto su sezioni istologiche di zebrafish adulto. I soggetti utilizzati per l'esperimento sono stati processati secondo metodiche istologiche di routine, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni seriali latero-laterali con uno spessore di 5µm e raccolte su vetrini gelatinizzati. Le sezioni sono state quindi sparaffinate, reidratate, colorate con Ematossilina ed Eosina e analizzate per l'analisi morfometrica utilizzando un microscopio ottico (Leica Microsystems DMI 6000 B, Wetzlar, Germany), una fotocamera (Leica Microsystems DFC 450 C, Wetzlar, Germany) ed un analizzatore di immagini (Leica Microsystems MMAF implementato da

Metamorph®, Wetzlar, Germany). Per ogni zebrafish analizzato, l'analisi morfometrica è stata eseguita su tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo, determinando nello specifico:

- area media del tessuto adiposo;
- numero medio degli adipociti;
- area media degli adipociti;
- densità media degli adipociti.

L'area media del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo di ogni soggetto, è stata ottenuta utilizzando la media aritmetica delle aree del tessuto adiposo analizzato ogni 100 µm e divisa per il numero delle sezioni osservate.

Anche il numero medio degli adipociti viscerali e sottocutanei è stato determinato con la media aritmetica, tramite la funzione di conteggio manuale del software Metamorph®, analizzati ogni 100 µm e diviso per il numero delle sezioni.

La stessa procedura, con l'uso della media aritmetica, è stata applicata per l'area media degli adipociti sottocutanei e viscerali, analizzando le sezioni istologiche ogni 100 µm, e dividendo per il numero di sezioni osservate.

Infine, la densità media degli adipociti è stata calcolata dividendo la media aritmetica del numero degli adipociti per l'area totale di grasso presente in

ciascuna sezione, sia per il deposito sottocutaneo che per quello viscerale, calcolata ogni 100  $\mu\text{m}$ .

### **3.8 Analisi statistica**

Tutti i dati sperimentali sono riportati come media  $\pm$  SEM (errore standard sulla media). Le analisi statistiche sono state eseguite con l'ANOVA a due vie. I valori di P inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

## **4 RISULTATI**

### **4.1 Misure di BMI e ponderali**

Il primo obiettivo ottenuto dalla sperimentazione è stato il raggiungimento dell'obesità nel gruppo sovralimentato (OF; 2,22 gr) che si distaccava significativamente dal peso del gruppo controllo (CTRL; 1,29 gr) alimentato con un singolo pasto giornaliero mostrando un chiaro aumento del BMI normalizzato del primo gruppo confrontato con il secondo (Fig. 1). Il secondo dato importante da sottolineare, obiettivo della presente tesi, è stato la significativa diminuzione del BMI dei sovralimentati trattati con flavonoidi (OF+ VITIS; 1,59 gr) rispetto agli obesi (OF; 2,22) soprattutto nelle ultime due settimane di trattamento (Fig.1).

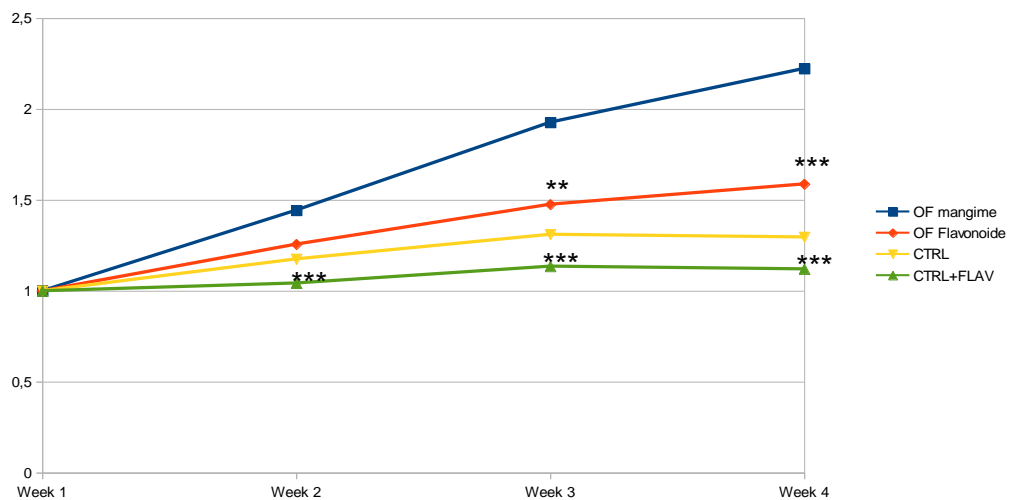
Risulta alquanto interessante osservare che nelle prime due settimane di sperimentazione non vi siano particolari e significativi cambiamenti in tutti i gruppi ma che cambiano significativamente a partire dalla terza settimana fino alla fine dell'esperimento.

La misura del peso corporeo ha mostrato un trend simile a quello del BMI alla fine della 4<sup>a</sup> settimana.

L'analisi statistica è stata eseguita per valutare differenze significative tra i dataset di BMI normalizzato. Il test dell'Anova a due vie ha mostrato differenze

ponderali significative tra i gruppi OF vs OF+VITIS alla terza ( $P<0,01$ ) e quarta settimana ( $P<0,001$ ) di trattamento e tra i gruppi CTRL vs CTRL+ VITIS alla seconda ( $P<0,001$ ), terza ( $P<0,001$ ) e quarta ( $P<0,001$ ) settimana di trattamento (Fig. 1). Contrariamente non ha mostrato significatività il confronto tra il gruppo OF vs OF+ VITIS soltanto nella seconda settimana di trattamento.

Dal momento che il BMI è un parametro composto e le misure iniziali variano da soggetto a soggetto, abbiamo analizzato la significatività statistica nel dataset di valori normalizzati, in modo tale da avere un punto di partenza uguale per tutti i gruppi (Fig 1, week1).



**Fig. 1** Grafico rappresentante l'andamento del BMI normalizzato in tutta la durata dell'esperimento (4 settimane) nei 4 gruppi sperimentali (CTRL, CTRL+VITIS, OF, OF+VITIS). La statistica è stata fatta seguendo l'ANOVA a 2 vie e sono stati considerati significativi i valori di P inferiori a 0,05 (\*,\*\* e \*\*\* rappresentano rispettivamente  $P\leq 0,05$ ,  $P\leq 0,01$  and  $P\leq 0,001$ ).



## 4.2 Analisi morfometrica del tessuto adiposo

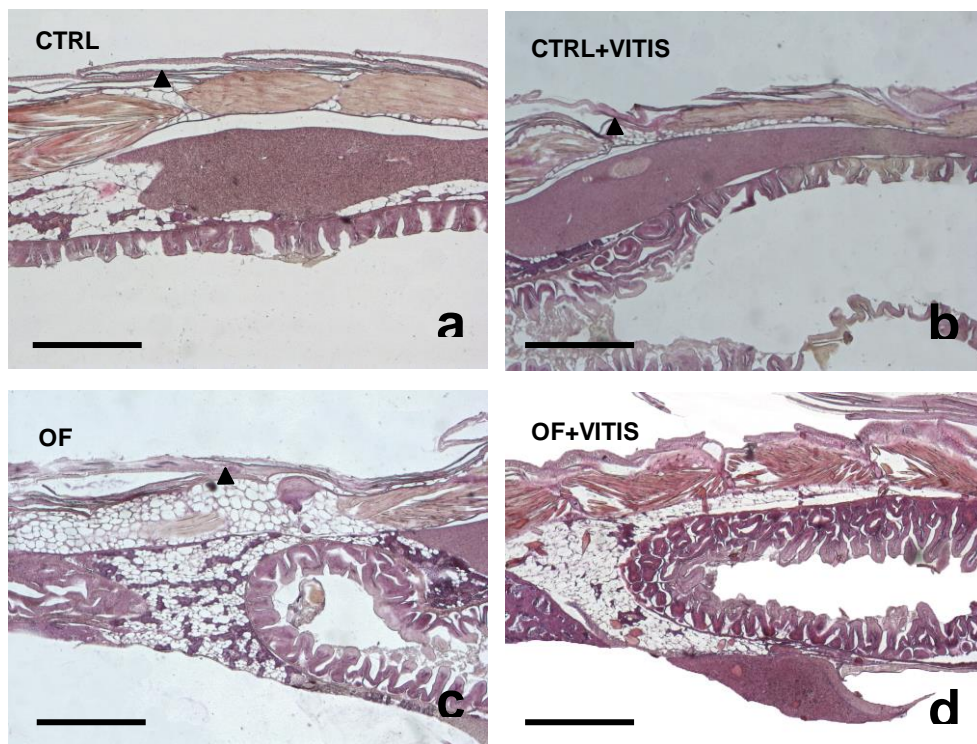
L'analisi morfometrica del grasso ha mostrato un diverso sviluppo dell'area del tessuto adiposo nei vari gruppi. Infatti, l'area media del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo ha presentato una differenza significativa (rispettivamente di  $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ ) tra il gruppo obeso (OF) e il gruppo obeso trattato con flavonide (OF+VITIS), (Fig 2 c, d; Fig. 3 a, b) mentre non ha mostrato nessuna significatività statistica il confronto tra il gruppo controllo (CTRL) e il gruppo controllo trattato con flavonoidi (CTRL+ VITIS) (Fig 2 1, b; Fig3 a, b).

La dimensione media degli adipociti viscerali appare significativamente differente ( $P < 0,001$ ) fra CTRL e CTRL+ VITIS come tra OF e OF+ VITIS ( $P < 0,001$ ) (Fig. 3c), indicando una riduzione della dimensione e un incremento del numero di cellule a ricoprire una stessa area di tessuto adiposo. Al contrario, la dimensione media degli adipociti sottocutanei mostra una differenza significativa ( $P > 0,001$ ) solo tra CTRL e OF (Fig 3d), mentre non si riscontra significatività tra CTRL vs CTRL+ VITIS e OF vs OF+ VITIS (Fig. 3d).

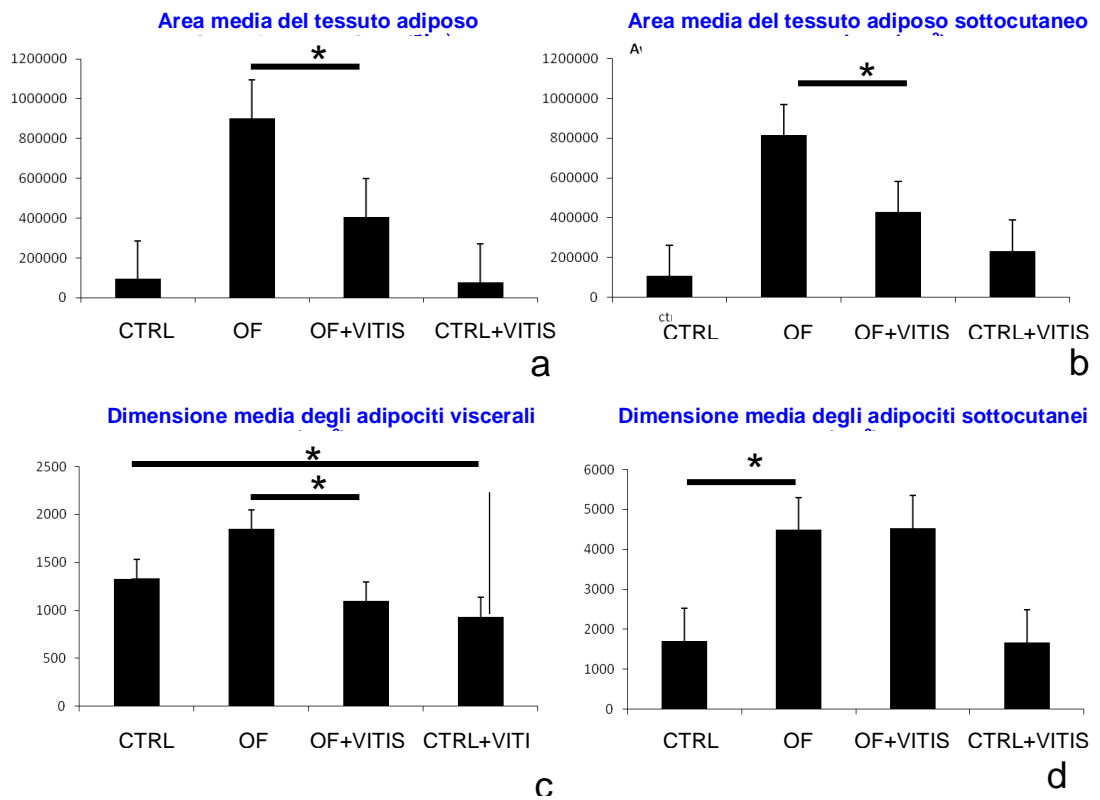
Il gruppo OF+ VITIS ha mostrato un decremento significativo del numero di adipociti viscerali ( $P < 0,001$ ) paragonati con l'OF (Fig. 4a). La densità degli adipociti viscerali nel gruppo OF+ VITIS, invece, risultava significativamente aumentata rispetto al gruppo OF (Fig 4c).

Il numero degli adipociti sottocutanei era conforme a quello viscerale riportando una differenza significativa ( $P < 0.001$ ) tra il gruppo OF vs OF+ VITIS (Fig 4b).

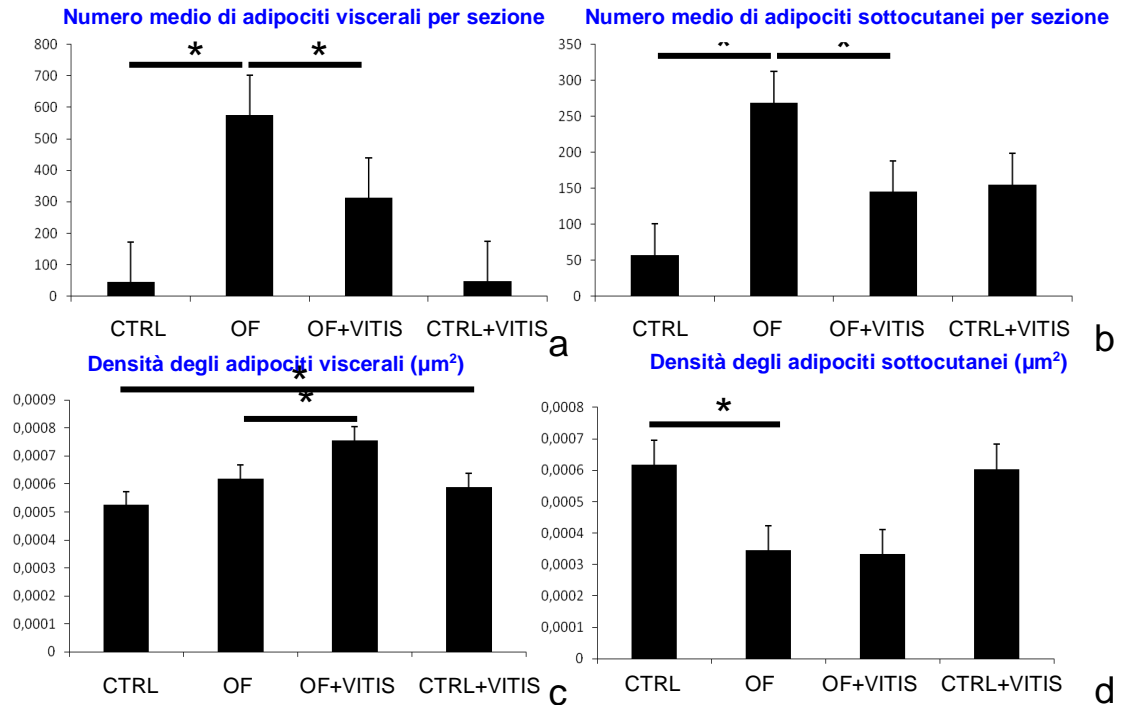
La densità degli adipociti sottocutanei non ha mostrato differenza significativa nei quattro gruppi ad eccezione del CTRL vs OF ( $P < 0,001$ ) (Fig. 4d).



**Fig. 2 (a-d)** Sezioni istologiche sagittali di zebrafish appartenenti ai quattro gruppi sperimentali (CTRL, CTRL+VITIS, OF, OF+VITIS) colorati con Ematossilina Eosina mostranti i depositi di grasso sottocutanei (testa di freccia) e viscerali (asterisco). Scale bars (a-d) 1mm.



**Fig. 3 (a, d)** Istogrammi mostrandoti i valori dell'analisi morfometrica del grasso sull'area media del tessuto adiposo viscerale (a), sull'area media del tessuto adiposo sottocutaneo (b), della dimensione media degli adipociti sottocutanei (c) e della dimensione media degli adipociti viscerali (d) nei quattro gruppi sperimentali (CTRL, CTRL+VITIS, OF, OF+VITIS). I valori sono espressi in  $\mu\text{m}^2$ . L'analisi statistica è stata fatta con il metodo dell'ANOVA a due vie e i valori di P minori di 0,05 sono stati considerati significativi. (\*, \*\* e \*\*\* rappresentano rispettivamente  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.001$ ).



**Fig. 4 (a-d)** Istogrammi mostranti i valori dell'analisi morfometrica del numero medio degli adipociti viscerali per sezione (a), del numero medio degli adipociti sottocutanei per sezione (b), della densità degli adipociti viscerali (c) della densità degli adipociti sottocutanei (d) nei quattro gruppi sperimentali (CTRL, CTRL+VITIS, OF, OF+VITIS). I valori sono espressi in  $\mu\text{m}^2$ . L'analisi statistica è stata fatta con il metodo dell'ANOVA a due vie e i valori di P minori di 0,05 sono stati considerati significativi. (\*, \*\* e \*\*\* rappresentano rispettivamente  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.001$ ).

### 4.3 qRT-PCR

#### Leptina

L'analisi della leptina nel cervello ha dimostrato nel CTRL (Fig. 5a) un più basso livello di espressione rispetto al CTRL+ VITIS. Il gruppo OF mostrava, invece, un aumento dell'espressione rispetto al gruppo CTRL e rispetto al gruppo OF+ VITIS. La diminuzione dei livelli di leptina risultava statisticamente significativa nel gruppo OF+VITIS vs OF (Fig 5a) ( $P < 0.05$ ).

Nell'intestino (Fig. 6 a) il livello più alto di espressione è stato osservato nel gruppo OF. L'mRNA presentava livelli più bassi nei gruppo CTRL e OF+VITIS e valori medi nel gruppo CTRL+ VITIS. Anche in questo caso è risultata statisticamente significativa la diminuzione dei livelli di leptina nel gruppo OF+VITIS vs OF (Fig 6 a) ( $P < 0.001$ ).

#### POMC

Nel cervello, il livello più alto di espressione è stato osservato nel gruppo OF. Mentre i valori risultavano più bassi rispettivamente nei gruppi OF+VITIS, CTRL+VITIS e CTRL (Fig. 5 b).

#### Grelina

L'analisi della grelina nel cervello ha dimostrato alti livelli di espressione nel gruppo OF rispetto al gruppo OF+VITIS, mentre ha mostrato livelli bassi nel CTRL

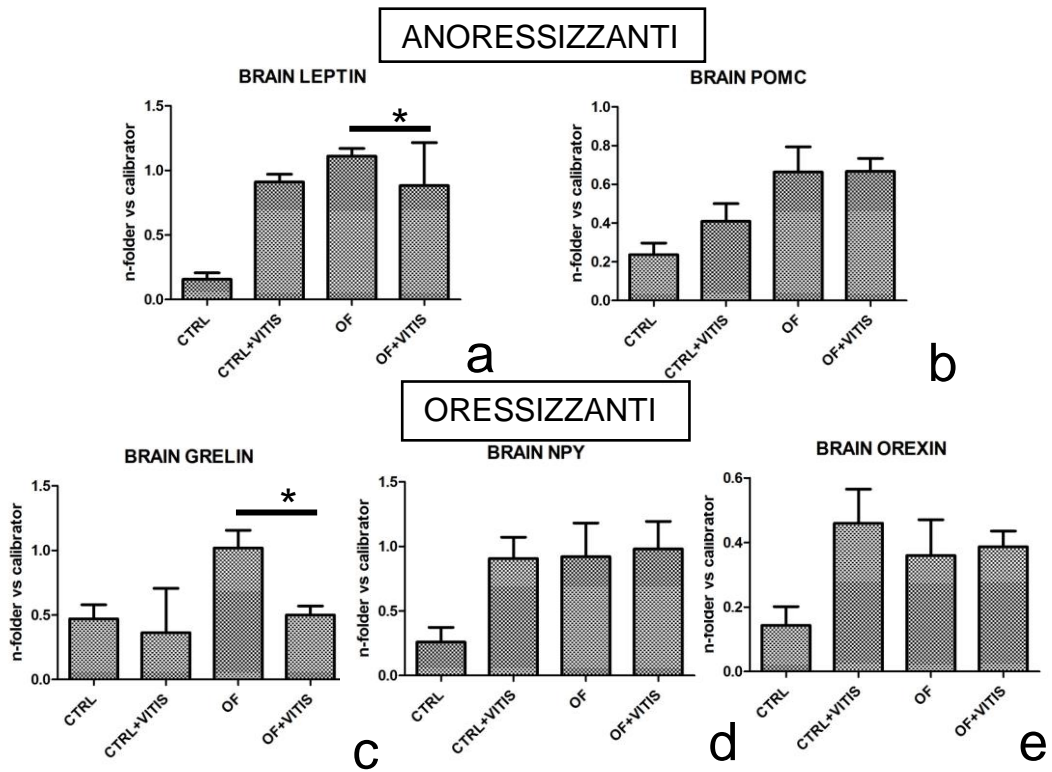
e nel CTRL+VITIS. Risultava statisticamente significativa la sua diminuzione nel gruppo OF+VITIS vs OF (Fig 5 c) ( $P < 0.05$ ). Nell'intestino l'espressione della grelina ha mostrato i livelli più alti nell'OF, mentre i valori raggiunti nei gruppi CTRL e CTRL+VITIS erano più bassi. Il valore nell'OF+VITIS paragonato a quello dell'OF è risultato più basso in maniera statisticamente significativa (Fig 6 c) ( $P < 0.05$ ).

#### NPY

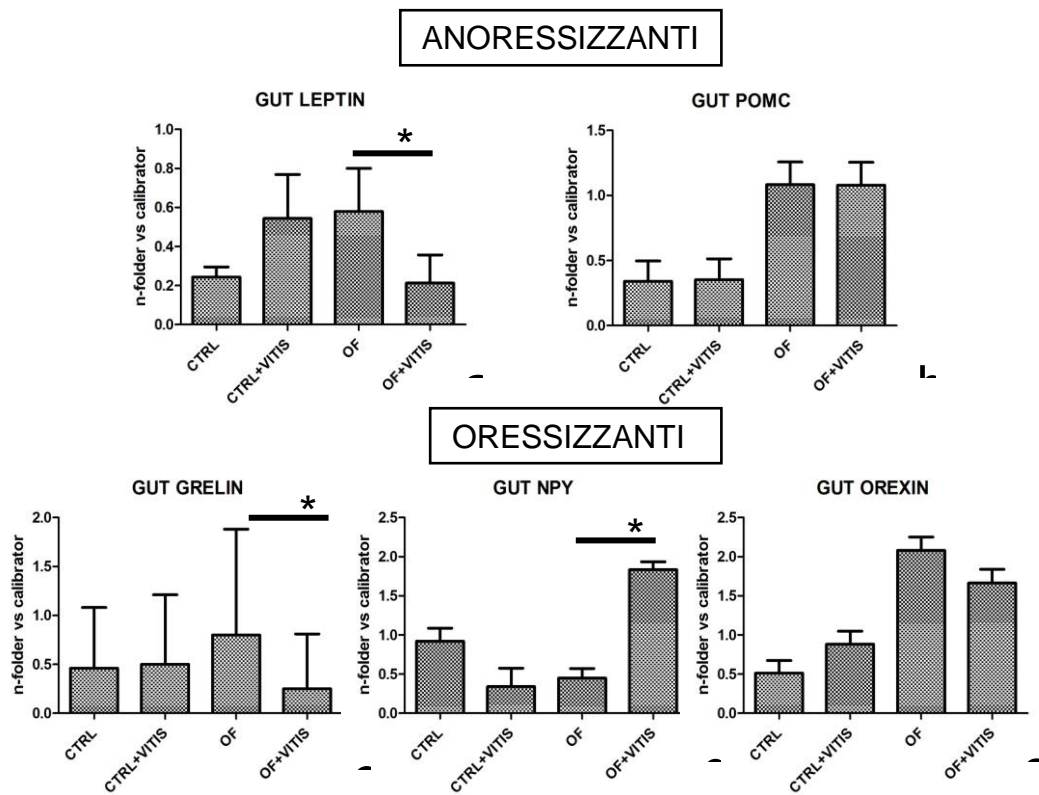
L'espressione dell'NPY nel cervello mostrava livelli aumentati nei gruppi CTRL+VITIS, OF e OF+VITIS rispetto al CTRL (Fig 5 d). Mentre nell'intestino il livello più alto di espressione è stato riscontrato nel gruppo OF+VITIS rispetto agli altri gruppi studiati, dove l'espressione risultava bassa soprattutto negli OF e nei CTRL+VITIS. Risultava statisticamente significativo il confronto tra il valore dell'OF vs OF+VITIS ( $P < 0,005$ ) (Fig 6 d).

#### Orexina

L'analisi dell'espressione nel cervello ha dimostrato alti livelli nel gruppo CTRL+VITIS, nell' OF e nel gruppo OF+VITIS, mentre ha mostrato livelli bassi nel CTRL (Fig 5 e). Nell'intestino l'espressione dell'orexina ha raggiunto i livelli più alti nell'OF e nell'OF+VITIS, mentre i livelli degli altri due gruppi analizzati erano più bassi (Fig 6 e).



**Fig. 5** qRT-PCR mostrante l'espressione dei livelli di leptina (a) POMC (b) grelina (c) , NPY (d) e orexina (e) nel cervello dei quattro gruppi sperimentali (ctrl, ctrl+VITIS, OF, OF+VITIS), ottenuti dall'algoritmo  $\Delta\Delta Ct$ . L'analisi statistica è stata fatta con il metodo dell'ANOVA a due vie e i valori di P minori di 0,05 sono stati considerati significativi. (\*, \*\* e \*\*\* rappresentano rispettivamente  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.001$ ).



**Fig. 6** qRT-PCR mostrante l'espressione dei livelli di leptina (a) POMC (b) grelina (c) , NPY (d) e orexina (e) nell'intestino dei quattro gruppi sperimentali (ctrl, ctrl+VITIS, OF, OF+VITIS), ottenuti dall'algoritmo  $\Delta\Delta C_t$ . L'analisi statistica è stata fatta con il metodo dell'ANOVA a due vie e i valori di P minori di 0,05 sono stati considerati significativi. (\*, \*\* e \*\*\* rappresentano rispettivamente  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.001$ ).



## 5. DISCUSSIONE

E' ormai noto che una varietà di flavonoidi estratti dai semi e dalla buccia dell'uva (*Vitis vinifera*) determini effetti benefici sulla salute. Tali composti hanno attirato l'attenzione per una serie di proprietà fisiologiche, per gli effetti antiossidanti e anti-diabetici negli animali e negli esseri umani con una ridotta incidenza di effetti collaterali negativi sulla salute (Bagchi et al, 2000; Pinent et al, 2004;Yamakoshi et al, 2002). Tuttavia, la comprensione delle azioni benefiche dei flavonoidi, dovute probabilmente ad una migliore funzionalità degli adipociti e all'ossidazione degli acidi grassi, ha bisogno di ulteriori indagini. Numerosi dati in letteratura indicano il ruolo dei flavonoidi sul bilancio energetico, sia a livello centrale che periferico. In particolare, essi hanno mostrato di potere influenzare positivamente sia il profilo metabolico che quello dei lipidi plasmatici, associato ad una riduzione del peso corporeo e dell'adiposità viscerale. Inoltre, i flavonoidi determinano un aumento della lipolisi nei soggetti obesi ( Jung et al., 2011; Tsujita and Takaku, 2007; Bok et al., 1999; Kang et al., 2012).

Pertanto in questo studio, al fine di esaminare i presunti effetti della somministrazione di flavonoidi presenti nell' estratto dai semi dell'uva (*Vitis vinifera*), si è utilizzato un modello di obesità indotta dalla dieta in zebrafish seguendo il protocollo di Oka e collaboratori (2010). Quest'ultimo prevede la

somministrazione di nauplii di Artemia che forniscono una dieta ricca di grassi poiché possiedono un tuorlo altamente ricco di grassi essenziali FAS PUFA e colesterolo (Gallagher e Brown 1975 Oka et al. 2010). Inoltre, il cibo vivo risulta più appetibile rispetto ai mangimi secchi arricchiti con il colesterolo puro o con altri alimenti inerti.

I nostri risultati hanno mostrato una riduzione del BMI e, a lungo termine, una diminuzione del peso corporeo in zebrafish OF+VITIS rispetto all' OF, suggerendo così un ruolo per questo flavonoide nell'influenzare il metabolismo dei carboidrati e, soprattutto, degli acidi grassi insaturi, come precedentemente dimostrato sui roditori (Park et al, 2008). Inoltre, i dati ottenuti dall'analisi morfometrica del tessuto adiposo mostravano una diminuzione delle dimensioni degli adipociti dei pesci OF+VITIS rispetto agli OF con un conseguenziale aumento del rapporto volume / superficie degli adipociti. Tale dato suggerisce che i depositi lipidici siano più facilmente disponibili per i processi metabolici.

La ricerca sull'obesità e sulla perdita di peso deve comprendere anche lo studio del ruolo e della funzione degli ormoni ipotalamici e intestinali che controllano il comportamento alimentare e l'omeostasi energetica, in connessione con i loro recettori nel sistema nervoso centrale (Perry e Wang, 2012).

I flavonoidi e le miscele di flavonoidi hanno differenti strutture chimiche e composizione e, pertanto, possono esercitare la loro azione attraverso più di un meccanismo (Galleano et al., 2012). Uno di questi meccanismi potrebbe essere quello di influenzare la sintesi di mRNA e/o la produzione di proteine di diversi geni connessi all'appetito. A tale scopo è stata effettuata l'analisi dell'espressione genica mediante qRT-PCR. I nostri risultati mostrano che i livelli dell'espressione di leptina e POMC (anoressizzanti) e grelina, orexina, e NPY (oressizzanti) sono influenzati dal trattamento con il flavonoide estratto dall'uva (*Vitis vinifera*). In particolare, gli OF+VITIS presentavano livelli bassi di espressione di leptina e grelina nel cervello rispetto agli OF, in linea con precedenti studi (Raasmaja et al. 2013). Risultati simili sono stati osservati per l'espressione di grelina nell'intestino. Pertanto, la riduzione del peso corporeo indotta dal trattamento con il flavonoide può derivare da due elementi (Calapai et al, 1999): un miglioramento del segnale della leptina associato all'obesità e una diminuzione del segnale della grelina causata da diete ad alto contenuto di grassi (Raasmaja et al., 2013).

In condizioni fisiologiche la grelina aumenta nell'intestino e nel circolo sanguigno prima dei pasti permettendo, in tal modo, di attivare a livello ipotalamico l'NPY i cui neuroni coesistono nell'ipotalamo e agiscono sinergicamente dando un

effetto oressizzante (Hassouna R 2016). Normalmente nei soggetti obesi i livelli basali di leptina risultano elevati mentre quelli di grelina ridotti, indicando un adattamento al cambiamento del bilancio energetico. Si è visto comunque che nell'obesità, nonostante i livelli basali di grelina siano ridotti, vi è una compromissione globale del pattern grelinico, con innalzamento eccessivo e duraturo del picco grelinico post-prandiale (Yildiz et al. 2004). Nella presente sperimentazione, invece, il trattamento con l'estratto di Vitis permetteva di ridurre e mantenere costantemente basso il livello di grelina determinando una riduzione della sensazione di fame e consequenzialmente dell'assunzione di cibo e della perdita di peso .

Inoltre, il trattamento con l'estratto di Vitis nell'OF (OF+VITIS) mostrava rispetto all'OF livelli più alti dell'espressione di NPY, sia a livello centrale che periferico. Tale aumento a livello cerebrale può essere giustificato da un comportamento analogo a quello osservato nei soggetti iperfagici. Infatti, in accordo a quanto riportato in letteratura, in soggetti privati dell'alimento per periodi prolungati si osservava a livello centrale un aumento dell'NPY e una diminuzione della leptina (Lauzurica N et al 2009). Per tale motivo si potrebbe ipotizzare che nei soggetti trattati con il flavonide continui l'assunzione di cibo per il conseguente aumento dell'effetto oressizzante dell'NPY, come nel caso degli obesi, ma al contempo ci

sia un contro bilanciamento da parte del flavonoide che determina un effetto anoressizzante mantenendo i livelli di POMC analoghi a quelli dell'obeso, contrastando così l'effetto obesità.

Il livello di POMC che, come la leptina, esercita un effetto di sazietà e inibisce il deposito di energia sia nei mammiferi che nei pesci, è sensibile alle variazioni del bilancio energetico e dell'assunzione di grassi (Cerdà-Reverter et al, 2011;. Cone, 1999; Novak et al., 2005) determinando cambiamenti del comportamento alimentare (Gantz e Fong, 2003) e del metabolismo lipidico (Piccinetti et al., 2013). Nel complesso, i risultati ottenuti confermano l'azione inibitoria dell'estratto di Vitis sull'assunzione di cibo, a sua volta regolata dai livelli di espressione di POMC.

L'orexina agisce centralmente e perifericamente sul dispendio energetico e sui depositi adiposi, influenzando la lipolisi del grasso bianco e la termogenesi del grasso bruno (Sakurai, 2014). I dati ottenuti mostrano livelli cerebrali di orexina bassi nel CTRL e alti nell'OF e nell' OF+ VITIS. Il risultato netto è un bilancio energetico negativo e un'adiposità ridotta (Perez-Leighton et al., 2014). Nell'intestino, invece, si notava una diminuzione dei livelli di espressione dell'orexina nell'OF +VITIS rispetto all' OF.

Questi risultati suggeriscono che l'effetto della diminuzione del grasso in seguito al trattamento con flavonoidi avverrebbe non solo per l'aumento dei livelli di espressione dell'orexina nel cervello, che modula l'assunzione di cibo e l'omeostasi del peso corporeo, ma anche tramite l'abbassamento dei livelli di espressione intestinale che potrebbero regolare l'assorbimento dei nutrienti. Tuttavia, questa ipotesi richiede ulteriori ricerche affinché possa essere meglio approfondita.

In conclusione, in base ai risultati ottenuti, possiamo suggerire che un'adeguata somministrazione di estratto di *Vitis* possa esercitare un'azione anti-obesità in un modello sperimentale di zebrafish obeso D.I.O. Inoltre, il presente lavoro fornisce un ulteriore contributo ai dati presenti in letteratura riguardanti gli effetti benefici dei flavonoidi sull'obesità, sottolineando così l'importante ruolo svolto dall'estratto di uva (*Vitis vinifera*) nell'influenzare il metabolismo degli acidi grassi insaturi, come precedentemente dimostrato (Park et al, 2008).

Infine, questi dati forniscono un valido supporto per l'utilizzo dello zebrafish come potente strumento per gli studi sull'obesità.



## **BIBLIOGRAFIA**

Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R 2000. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol Carcinog* 28: 129–138.

Ahima RS 2005. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab* 16(7):307-13.

Ahima RS, Osei SY 2004. Leptin signaling. *Physiol Behav* 81(2):223-41.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicol* 148: 187–197.



Bang PI, Sewell WF, Malicki JJ 2001. Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001 Sep 17;438(2):173-190.

Bates SH, Myers MG Jr 2003. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab*. 14(10):447-52.

Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS 1999. "Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids," *J Nutr*, 129; 6: 1182–1185.

Bomser JA, Singletary KW, Wallig MA, Smith ML 1999. Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Lett* 135: 151–157.

Calapai G, Firenzuoli F, Saitta A, Squadrito F, Arlotta MR, Costantino G, Inferrera G 1999. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of Citrus aurantium extracts in the rat. *Fitoterapia* 70: 586-592.

Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF 1997. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(12):4270-3.

Charradi K, Elkahoui S, Karkouch I, Limam F, Hassine FB, Aouani E 2012. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. *Neurochem Res* 37: 2004–2013.

Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275(5296):88-90.

Cinti S, de Matteis R, Ceresi E, Picó C, Oliver J, Oliver P, Palou A, Obrador A, Maffei C 2001. Leptin in the human stomach. *Gut* 49(1):155.

Cone RD 1999. The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 10:211-216.

Copeland DL, Duff RJ, Liu Q, Prokop J, Londraville RL 2011. Leptin in Teleost Fishes: An Argument for Comparative Study. *Front Physiol* 2: 26.

Curin Y, Ritz MF, Andriantsitohaina R 2006. Cellular mechanisms of the protective effect of polyphenols on the neurovascular unit in strokes. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4: 277–288.

De Freitas VP, Glories Y 1999. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *J Sci Food Agr* 79: 1601–1606.

Doyon C, Drouin G, Trudeau VL, Moon TW 2001. Molecular evolution of leptin. *Gen Comp Endocrinol* 124: 188-198.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK 1999. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23(4):775-86.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287: 356–359.

Gantz I, Fong TM 2003. The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E468-74.

García-García F, Juárez-Aguilar E, Santiago-García J, Cardinali DP 2014. Ghrelin and its interactions with growth hormone, leptin and orexins: implications for the sleep-wake cycle and metabolism. *Sleep Med Rev* 18: 89-97.

Gorissen M, Bernier NJ, Nabuurs SB, Flik G, Huising MO 2009. Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *J Endocrinol.* 201(3):329-39.

Halberg N, Henriksen M, Soerderhamn N, Stallknecht B, Ploug T, Schjerling P, Dela F 2005. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *J. Appl. Physiol.* 99, 2128–2136.

Hasler CM 2000. The changing face of functional foods. *J Am Coll Nutr* 19:499S-506S.

Hassouna R, Labarthe A, Tolle V 2016. Hypothalamic regulation of body growth and appetite by ghrelin-derived peptides during balanced nutrition or undernutrition. *Mol Cell Endocrinol* 00438:42-51.

Hogan S, Canning C, Sun S, Sun X, Kadouh H, Zhou K 2011. Dietary supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in

diet-induced obese mice fed a Western high fat diet. *J Agric Food Chem* 13;59(7): 3035-41.

Hölttä-Vuori M., Salo VT, Nyberg L, Brackmann C, Enejder A, Panula P, Ikonen E 2010. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem J* 429: 235-242.

Huising MO, Geven EJ, Kruiswijk CP, Nabuurs SB, Stolte EH, Spanings FA, Verburg-van Kemenade BM, Flik G. 2006. Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinol* 147(12):5786-97.

Johnson RM, Johnson TM, Londraville RL 2000. Evidence for leptin expression in fishes. *J Exp Zool* 286(7):718-24.

Jung HJ, Jeong YS, Park CD, Park CH, Hong JH 2011. "Inhibitory effect of citrus peel extract on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes" *J Appl Biol Chem* 54; 2: 169–176.

Kang SI, Shin HS, Kim HM Hong YS, Yoon SA, Kang SW, Kim JH, Kim MH, Ko HC, Kim SJ 2012. "Immature Citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by  $\beta$ -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice," Biol Pharm Bulletin 35; 2: 223–230.

Kurokawa T, Murashita K, Suzuki T, Uji S 2008. Genomic characterization and tissue distribution of leptin receptor and leptin receptor overlapping transcript genes in the pufferfish,

Kurokawa T, Uji S, Suzuki T 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, Takifugu rubripes. Peptides 26(5):745-50.

Lauzurica N, García-García L, Pinto S, Fuentes JA, Delgado M 2009. Changes in NPY and POMC, but not serotonin transporter, following a restricted feeding/repletion protocol in rats. Brain Res 1313:103-12.

Lieschke GJ, Currie PD 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nat Rev Genet. 8(5):353-67.

Liu Q, Chen Y, Copeland D, Ball H, Duff RJ, Rockich B, Londraville RL 2010. Expression of leptin receptor gene in developing and adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 166(2):346-55.

Lo Furno D, Graziano ACE, Avola R, Giuffrida R, Perciavalle V, Bonina F, Mannino G, Cardile V 2016. A Citrus bergamia Extract Decreases Adipogenesis and Increases Lipolysis by Modulating PPAR Levels in Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue. *PPAR Res* 4563815.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3(9):1029-33.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I 2003. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 19: 876–879.



Murashita K, Uji S, Yamamoto T, Rønnestad I, Kurokawa T 2008. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 150(4):377-84.

Novak CM, Kotz CM, Levine JA 2006. Central orexin sensitivity, physical activity, and obesity in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(2):E396-403.

Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, Tanaka T 2010. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol* 21;10:21.

O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL 2012. Fruit juice consumption is associated with improved nutrient adequacy in children and adolescents: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006. *Nutr J* 11: 107.

Pandey KB and Rizvi SI 2009. "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278.

Park SH, Park TS, Cha YS 2008. Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Nutr Res Pract*. 2(4):227-33.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995, 269(5223):540-543.

Perez-Leighton CE, Billington CJ, Kotz CM 2014 Orexin modulation of adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1842:440-5.

Perry B, Wang Y 2012. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutr Diabetes* 2:e26.

Pfeiffer J, Kuhnel C, Brandt J, Duya D, Punyasirib PAN, Forkmann G, Fischera TC 2006. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiol Biochem* 44: 323–334.

Piccinetti CC, Migliarini B, Olivotto I, Coletti G, Amici A, Carnevali O 2010. Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio*. *Horm Behav* 58:780-5.

Piccinetti CC, Migliarini B, Olivotto I, Simoniello MP, Giorgini E, Carnevali O 2013. Melatonin and peripheral circuitries: insights on appetite and metabolism in *Danio rerio*. *Zebrafish* 10:275-82.

Piccinetti CC, Ricci LA, Tokle L, Radaelli G, Pascoli F, Cossignani L, Palermo F, Mosconi G, Nozzi V, Raccanello F, Olivotto I 2012. Malnutrition may affect common sole (*Solea solea* L.) growth, pigmentation and stress response: molecular, biochemical and histological implications. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 161: 361-71.

Pinent M, Blay M, Bladé MC, Salvadó MJ, Arola L, Ardévol A 2004. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinol* 145(11): 4985-90.

Raasmaja A, Lecklin A, Li XM, Zou J, Zhu GG, Laakso I, Hiltunen R 2013. A water-alcohol extract of *Citrus grandis* whole fruits has beneficial metabolic effects in the obese Zucker rats fed with high fat/high cholesterol diet. *Food Chem* 138: 1392-1399.

Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, and Kohli K 2009. "Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review," *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 8; 3: 229–235.

Russo F, Gatta C, De Girolamo P, Cozzi B, Giurisato M, Lucini C, Varricchio E 2012. Expression and immunohistochemical detection of leptin-like peptide in the

gastrointestinal tract of the South American sea lion (*Otaria flavescens*) and the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Anat Rec (Hoboken)* 295(9):1482-93.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, 1998: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. Mar 6; 92(5):1.

Schlegel A, Stainier DY 2007. Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet*. 2007, 3(11):e199.

Seth A, Stemple DL, Barroso I 2013. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Dis Model Mech*. 2013, 6(5):1080-8.

Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ 2000. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47(2):178-83.

Stern JH, Rutkowski JM and Scherer PE 2016. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metabolism* 23: 770-786.

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291(5813):293-6.

Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Zang L, Oka T, Nishimura Y, Nishimura N, Tanaka T 2011. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutr Metab (Lond)* 13;8:88.

Takifugu rubripes. *Gen Comp Endocrinol* 158(1):108-14.

Tsujita T and Takaku T 2007. Lipolysis induced by segment wall extract from Satsuma mandarin orange (*Citrus unshu* Mark), *J Nutr Sci Vitaminol* 53; 6: 547–555.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393(6686):684-8.

Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol* 40: 599–607.

Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J 2004. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28):10434-9.

Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY, Liu NF 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *Int Immunopharmacol* 5: 1247–1257.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994.  
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature  
372(6505):425-32.



## **INDICE**

<b>CAPITOLO 1. Introduzione</b>	<b>1</b>
<i>1.1. Lo Zebrafish come modello sperimentale</i>	<b>8</b>
<i>1.2.. Zebrafish e obesità</i>	<b>10</b>
<i>1.3. Neuropeptidi coinvolti nel controllo dell'appetito</i>	<b>12</b>
<i>1.3.1 Leptina</i>	<b>14</b>
<i>1.3.2. POMC</i>	<b>17</b>
<i>1.3.3 Grelina</i>	<b>19</b>
<i>1.3.4. Orexina</i>	<b>21</b>
<i>1.3.5. NPY</i>	<b>22</b>
<i>1.4 Flavonoidi e obesità</i>	<b>25</b>
<i>1.4.1. Vitis Vinifera</i>	<b>27</b>
<b>CAPITOLO 2.Obiettivi</b>	<b>29</b>
<b>CAPITOLO 3. Materiali e metodi</b>	<b>30</b>

<i>3.1. Regolamentazione della sperimentazione animale</i>	30
<i>3.2. Zebrafish breeding</i>	30
<i>3.3. Modello sperimentale di zebrafish obeso D.I.O. (Diet Induced Obesity) e trattato con flavonoidi</i>	31
<i>3.4. Misura dell'indice di massa corporea (BMI) e processazione dei campioni</i>	33
<i>3.5. Trattamento del tessuto</i>	34
<i>3.6. qRT-PCR</i>	34
<i>3.7. Morfologia e studio morfometrico: analisi degli adipociti dello zebrafish</i>	36
<i>3.8. Analsi statistica</i>	38
<b>CAPITOLO 4. Risultati</b>	39
<i>4.1. Misure di BMI e ponderali</i>	39
<i>4.2. Analisi morfometrica del tessuto adiposo</i>	41
<i>4.3 qRT-PCR</i>	45

***CAPITOLO 5. Discussione***

49

***BIBLIOGRAFIA***

56