

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

"FEDERICO II"

Dipartimento di Strutture, Funzioni e

Tecnologie Biologiche

DOTTORATO DI RICERCA

"Biologia, Patologia e Igiene ambientale in

Medicina Veterinaria"

XVIII CICLO

Anno acc. 2002/03-2004/05

**CONTROLLO DELL'ASSUNZIONE DI CIBO IN
VERTEBRATI NON-MAMMIFERI DI INTERESSE
VETERINARIO: LOCALIZZAZIONE E DISTRIBUZIONE
IMMUNOISTOCHIMICA DI PEPTIDI ORESSIZZANTI ED
ANORESSIZZANTI NEL TRATTO GASTROENTERICO DI
PESCI E UCCELLI**

Tutor

Chiar.mo Prof.

Giuliana Gargiulo

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Giuseppe Paino

Candidato

Dott. Simona Neglia

Ai miei genitori e a mio fratello Luca, senza il cui sostegno non avrei potuto raggiungere i traguardi più importanti della mia vita.

A Paola e Salvatore, i miei adorati angeli custodi.

A Gaia, la piccola stella che brilla nel mio futuro.

A Giuseppe, il mio futuro.

INDICE

CAPITOLO 1.

Alimentazione animale e meccanismi di controllo dell'appetito Pag. 7

- 1.1. Aspetti generali ed importanza dell'alimentazione
degli animali domestici 7
- 1.2. Meccanismi di controllo dell'appetito e del peso corporeo 13

CAPITOLO 2.

Controllo centrale dell'appetito. Ruolo dei neuropeptidi ipotalamici 18

- 2.1. Neuropeptidi ipotalamici oressigeni 19
 - 2.1.1. *Neuropeptide Y (NPY)* 19
 - 2.1.2. *Agouti-related protein (AgRP)* 20
 - 2.1.3. *Melanin-concentrating hormone (MCH)* 21
 - 2.1.4. *Altri neuropeptidi oressizzanti* 22
 - 2.1.5. *Orexine* 24
 - 2.1.5.1. Generalità 24
 - 2.1.5.2. Struttura e recettori 25
 - 2.1.5.3. Effetti biologici 26
- 2.2. Neuropeptidi ipotalamici anoressigeni 28
 - 2.2.1. *Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)* 28
 - 2.2.2. *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)* 29
 - 2.2.3. *Corticotropin-releasing factor (CRF)* 30
 - 2.2.4. *Serotonina (5HT)* 31

CAPITOLO 3.

Sistema periferico “a lungo termine”	Pag. 33
3.1. Leptina	33
3.1.1. Generalità	33
3.1.2. Struttura e sintesi	34
3.1.3. Recettori per la leptina (Ob-R)	37
3.1.4. Effetti biologici	39

CAPITOLO 4.

Sistema periferico “a breve termine”	43
4.1. Nutrienti	44
4.2. Peptidi gastrointestinali	47
4.2.1. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)	48
4.2.1.1. Generalità	48
4.2.1.2. Struttura e sintesi	48
4.2.1.3. Effetti biologici	50
4.2.2. Grelina	53
4.2.2.1. Generalità	53
4.2.2.2. Struttura e sintesi	53
4.2.2.3. Effetti biologici	57

PARTE SPERIMENTALE	59
---------------------------	----

CAPITOLO 5.

Scopo della ricerca	60
----------------------------	----

CAPITOLO 6

Anatomia dell'apparato digerente dei Pesci.	63
6.1. Intestino craniale	63

6.2. Intestino anteriore	Pag. 64
6.3. Intestino medio	68
6.4. Intestino posteriore	70
CAPITOLO 7.	
Anatomia del tratto gastroenterico degli Uccelli	72
7.1. Stomaco	72
7.1.1. <i>Stomaco ghiandolare</i>	73
7.1.2. <i>Stomaco muscolare</i>	77
7.2. Intestino	81
7.2.1. <i>Intestino tenue</i>	81
7.2.2. <i>Intestino crasso</i>	83
CAPITOLO 8.	
Materiali e metodi	91
8.1. Animali ed allestimento dei campioni	91
8.2. Immunoistochimica	93
CAPITOLO 9.	
Risultati	98
9.1. Grelina	98
9.1.1. <i>Gallus domesticus</i>	98
9.1.2. <i>Dicentrarchus labrax</i>	99
9.1.3. <i>Carassius auratus</i>	101
9.2. Leptina	102
9.2.1. <i>Gallus domesticus</i>	102
9.2.2. <i>Dicentrarchus labrax</i>	104
9.2.3. <i>Carassius auratus</i>	105

9.3. Orexine	106
9.3.1. <i>Gallus domesticus</i>	106
9.3.2. <i>Dicentrarchus labrax</i>	107
9.3.3. <i>Carassius auratus</i>	109
9.4. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)	111
9.4.1. <i>Gallus domesticus</i>	111
9.4.2. <i>Dicentrarchus labrax</i>	112
9.4.3. <i>Carassius auratus</i>	113
Tavole fotografiche	114
CAPITOLO 10.	
Discussione	151
10.1. Grelina	152
10.2. Leptina	160
10.3. Orexine	167
10.4. GLP-1	175
CAPITOLO 11.	
Considerazioni conclusive	179
BIBLIOGRAFIA	181
RINGRAZIAMENTI	232

CAPITOLO 1.

ALIMENTAZIONE ANIMALE E MECCANISMI DI CONTROLLO DELL'APPETITO

1.1. ASPETTI GENERALI ED IMPORTANZA DELL'ALIMENTAZIONE DEGLI ANIMALI DOMESTICI

E' stato opportunamente rilevato, come necessaria premessa allo studio dei fenomeni della nutrizione, che vi sono tre aspetti dominanti nel comportamento di tutti gli animali superiori, uomo compreso: la ricerca del cibo, l'istinto di conservazione, che si manifesta con i più svariati meccanismi di difesa, e l'attrazione sessuale. Di questi il più importante è sicuramente il primo, in quanto condiziona, ovviamente, sia la conservazione della vita che la riproduzione della specie. In effetti, secondo un postulato fondamentale della biologia moderna, l'organismo animale, quale ci appare nel complesso dei suoi caratteri, è il risultato dell'interazione tra i fattori intrinseci di sviluppo, a loro volta determinati dall'informazione genetica avuta in eredità dall'individuo, e le molteplici influenze dell'ambiente fisico ed ecologico nel quale l'animale nasce, cresce e compie il proprio ciclo vitale. Di tutti i fattori ambientali la disponibilità e la qualità del cibo assumono un ruolo prioritario, in quanto esercitano una profonda influenza sia

sull'accrescimento che sulle produzioni dei nostri animali domestici. Si può infatti affermare, senza esagerare, che nella maggioranza dei casi l'importanza dell'alimentazione nel determinismo delle caratteristiche produttive degli animali d'allevamento, è almeno pari a quella dei fattori genetici e dell'ambiente fisico presi nel loro insieme.

L'importanza dell'alimentazione nella pratica dell'allevamento e dello sfruttamento degli animali domestici deve essere considerata, per poterla comprendere a pieno, da tre punti di vista: come fattore di esaltazione delle capacità produttive degli animali, come fattore sanitario e di prevenzione delle malattie, e, non ultimo, come fattore economico delle produzioni zootecniche.

1) L'alimentazione come fattore di esaltazione delle capacità produttive degli animali.

L'alimentazione esercita una profonda influenza sull'accrescimento degli animali, in quanto l'organismo aumenta di peso e di dimensioni e si sviluppa in senso morfogenetico proprio in virtù dei processi di moltiplicazione e di differenziazione cellulare che sono il risultato finale dei processi assimilativi che si svolgono nelle cellule. Parimenti la secrezione di latte, la deposizione di grasso e il lavoro muscolare, sono processi fisiologici che implicano una trasformazione materiale ed energetica delle sostanze nutritive assorbite e trasportate dagli umori circolanti rispettivamente alla ghiandola mammaria, al

tessuto connettivo e alle fibre muscolari. La maggiore o minore disponibilità di sostanze nutritive ed i rapporti con i quali queste si trovano negli alimenti, rappresentano dunque un fattore essenziale nel determinare lo sviluppo e le produzioni dei nostri animali. L'altro fattore di base è dato dalla costituzione genetica dell'individuo, causa prima delle caratteristiche e delle attitudini funzionali dello stesso. Infatti, animali del tutto simili per conformazione e per mole possono avere in realtà attitudini eccellenti o mediocri nei riguardi della produzione di latte e della sua ricchezza in grasso, nella capacità di ingrassamento e di utilizzazione degli alimenti, nella potenza muscolare e nella resistenza al lavoro. Quindi, solo mediante una alimentazione adeguata ai bisogni nutritivi dell'organismo è possibile mettere in evidenza la capacità di accrescimento, di produzione del latte e di ingrassamento che gli animali possiedono, allo stato potenziale, nel loro patrimonio genetico.

2) L'alimentazione come fattore sanitario e di prevenzione delle malattie.

Quando gli animali domestici consumano per periodi di tempo abbastanza lunghi delle razioni alimentari insufficienti da un punto di vista quantitativo o deficienti di sostanze essenziali ai processi nutritivi e metabolici, come nel caso di taluni aminoacidi, vitamine ed elementi minerali, si manifestano turbamenti

funzionali ed alterazioni dello stato di salute che possono limitarsi, nei casi “lievi”, ad una riduzione più o meno marcata dell’accrescimento, della attività produttive e delle capacità riproduttive, o determinare nelle forme gravi la comparsa di sindromi cliniche e/o di vere e proprie malattie. L’alimentazione è concordemente riconosciuta come fattore di grande importanza nel determinismo del grado di resistenza dell’organismo di fronte alle cause patogene in generale, sia nel caso di agenti infettivi (batteri e virus) che di agenti fisico-ambientali stressanti. Infatti, una deficiente difesa immunitaria dell’organismo che consegue ad uno stato di iponutrizione cronica od a carenze vitaminiche e minerali, rappresenta l’elemento predisponente all’insorgere di gravi malattie infettive, di cui la vecchia medicina considerava solo l’aspetto batteriologico.

3) L’alimentazione come fattore economico delle produzioni zootecniche.

Le precedenti considerazioni sulle perdite di prodotti e sullo sciupio di alimenti causato dall’impiego di razioni deficienti dal lato qualitativo, quantitativo o sotto entrambi gli aspetti, fanno agevolmente comprendere quale sia l’importanza del fattore alimentare nella economia delle produzioni animali. Queste sono, pur nella estrema varietà dei tipi, delle trasformazioni di materie prime non utilizzabili direttamente dall’uomo (foraggi e mangimi)

in derrate alimentari. Ovviamente il prezzo di trasformazione dei foraggi, che risulta dal bilancio tra i prodotti ottenuti dagli animali e le spese relative, è tanto maggiore quanto più piccola è la quantità di foraggio consumato dagli animali. Quindi, il successo economico di un allevamento animale è strettamente dipendente dal rendimento di trasformazione dei foraggi e dei mangimi in carne, latte etc. e non meno dal costo di produzione o di acquisto di questi alimenti. Perciò, è indispensabile esaltare la capacità di utilizzazione alimentare degli animali, cioè il loro rendimento in carne, latte o altri prodotti, in modo da ottenere il reddito globale più elevato da una medesima quantità di foraggi e/o di mangimi prodotti in allevamento. Tutti i mezzi tecnici che mirano al miglioramento delle razze e delle popolazioni animali attraverso la selezione e gli altri metodi di riproduzione, le cure di allevamento e l'alimentazione, tendono in definitiva a questo fondamentale scopo economico. Non è compito agevole, anche con l'impiego di idonei mezzi di indagine, precisare il contributo del miglioramento genetico, dei sistemi d'allevamento e sfruttamento e della alimentazione; ma non vi è dubbio che questo ultimo fattore sia preminente in molte situazioni. Senza svalutare i grandi progressi apportati dalla selezione e dagli altri metodi di miglioramento genetico degli animali, bisogna riconoscere che i benefici che si ottengono mediante una alimentazione razionale degli animali

sono di rapida realizzazione e di notevole evidenza, per cui risulta di fondamentale importanza la comprensione dei meccanismi che presiedono al controllo dell'assunzione di cibo e dell'incremento ponderale negli allevamenti intensivi.

1.2. MECCANISMI DI CONTROLLO DELL'APPETITO E DEL PESO CORPOREO

Molteplici, complessi ed ancora non del tutto chiari sono i meccanismi che presiedono al controllo dell'assunzione di cibo negli animali e che, di conseguenza, risultano implicati nella regolazione dell'omeostasi energetica e del peso corporeo.

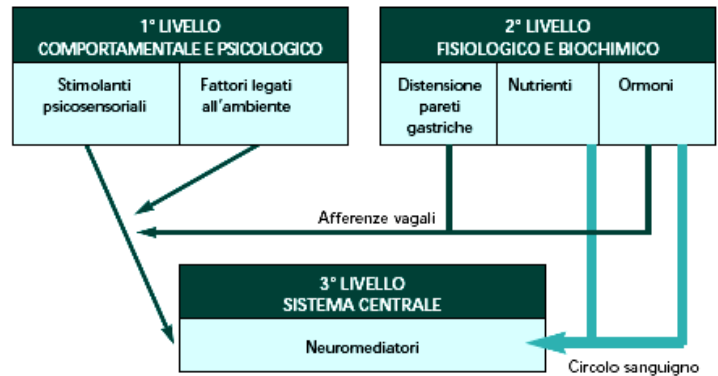
Schematicamente è possibile distinguere tre livelli di controllo dell'appetito:

- 1°) comportamentale e psicologico;
- 2°) fisiologico e biochimico;
- 3°) cerebrale.

Al primo livello appartengono gli eccitanti psicosensoriali come il colore, l'odore, la consistenza e l'appetibilità di un alimento, ma anche fattori più strettamente correlati all'ambiente come le condizioni climatiche, la disponibilità, la qualità e la quantità del cibo. Successivamente, il modo con cui gli alimenti vengono assaporati, digeriti e metabolizzati dall'organismo, evoca una serie di risposte umorali e nervose che nel loro insieme costituiscono il secondo e il terzo livello (Blundell J.E. and Hill A.J., 1993). E' proprio in questo ambito che sono state elaborate numerose teorie al fine di spiegare gli intimi meccanismi che agiscono sul Sistema Nervoso

Centrale (SNC) e che contribuiscono al mantenimento di un peso corporeo stabile.

Meccanismi di controllo dell'appetito



Il modello a cui si fa riferimento attualmente prevede l'esistenza di un centro superiore di controllo dell'assunzione del cibo localizzato nell'ipotalamo dei Mammiferi, in grado di integrare i numerosi stimoli esogeni ed endogeni, originatisi dal comportamento alimentare, e perciò di influenzare il bilancio energetico dell'organismo. Infatti, nell'ipotalamo sono state ormai individuate delle aree specializzate costituite da neuroni, associati in determinati nuclei sintetizzanti neuropeptidi e/o neurotrasmettitori, e da una complessa rete nervosa che riceve afferenze da regioni visive, limbiche e motorie.

Studi condotti negli anni '50 ed inerenti lesioni e stimolazioni elettriche dei vari nuclei ipotalamici hanno attribuito per la prima volta al nucleo ventromediale (VMN) il ruolo di "centro della sazietà"

ed all'area ipotalamica laterale (LH) il ruolo di "centro della fame" (Stellar E., 1994). Infatti, negli animali da laboratorio la distruzione del VMN causava iperfagia ed obesità, mentre lesioni dell'ipotalamo laterale sopprimevano completamente l'istinto della fame e portavano ad una graduale riduzione del peso corporeo fino al raggiungimento di uno stato cachettico (Oomura Y., 1980; Bernardis and Bellinger, 1996). Attualmente, però, anziché imputare il controllo dell'omeostasi energetica a singoli e specifici nuclei dell'ipotalamo, si è accertato che contribuiscono a questa regolazione veri e propri circuiti neuronali includenti non solo molteplici aree ipotalamiche specializzate (nucleo dorsomediale (DMN), nucleo paraventricolare (PVN), nucleo arcuato (ARC)), ma anche altri distretti cerebrali (Kalra et al., 1999; Schwartz et al., 2000). Tra questi vi è il tratto inferiore del tronco encefalico ed, in particolare, il complesso vagale dorsale, che riceve ed integra le informazioni in arrivo dagli organi endocrini autonomi periferici e da diverse aree del SNC. Circuiti neuronali del ponte mesencefalico e del talamo interpretano poi queste informazioni in rapporto ai segnali generati dalle proprietà meccaniche dei cibi, rilevate a diversi livelli del sistema gastrointestinale. L'amigdala e la corteccia frontale sono responsabili, invece, di funzioni più elevate che coinvolgono l'integrazione di informazioni cognitive riguardanti la sensazione di piacevolezza o di avversità verso il cibo.

Il controllo centrale dell'assunzione di cibo non è però sufficiente da solo a giustificare nel tempo il mantenimento di un peso corporeo stabile. Il peso corporeo, infatti, si mantiene costante quando l'energia apportata con la dieta è perfettamente bilanciata da quella spesa per le attività metaboliche e l'esercizio fisico. Se ne deduce che esiste un complesso sistema di interazioni tra il centro e la periferia volto alla regolazione dell'omeostasi energetica. Infatti, al centro di controllo ormonale superiore pervengono specifici input 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 invia all'ipotalamo segnali relativi alla presenza di cibo nel tratto gastrointestinale e di nutrienti nel circolo sistemico, ed un “sistema periferico a lungo termine” che fornisce all'ipotalamo informazioni sulla quantità e sulla consistenza di tessuto adiposo e, soprattutto, sul bilancio energetico globale dell'organismo.

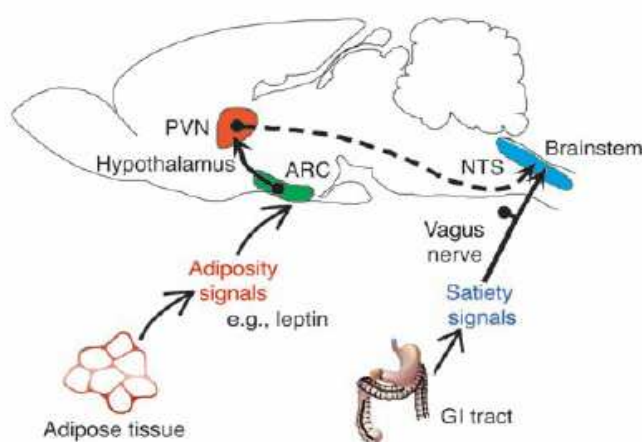


Illustrazione schematica delle interazioni esistenti tra il SNC e i due sistemi periferici. Da Morton et al., 2005

I neuroni ipotalamici coinvolti nel controllo dell'appetito sintetizzano un numero cospicuo di neuropeptidi e/o neurotrasmettitori in grado di stimolare o inibire l'assunzione di cibo, a seconda dei casi, interagendo con i segnali provenienti dalla periferia attraverso le terminazioni nervose afferenti ed il circolo sistemico.

CAPITOLO 2.

CONTROLLO CENTRALE DELL'APPETITO.

RUOLO DEI NEUROPEPTIDI IPOTALAMICI

I neuropeptidi elaborati da taluni nuclei ipotalamici e coinvolti nel controllo dell'assunzione di cibo possono essere distinti, in base alla azione stimolante od inibente l'appetito, in oreoressigenici (o anabolici) ed anoressigenici (o catabolici). Tra i primi è possibile annoverare: Neuropeptide Y (NPY), Agouti-related protein (AgRP), Melanin-concentrating hormone (MCH), Galanina (GAL), Orexina A e Orexina-B. I principali neuropeptidi ad azione anoressizzante sono: Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), Corticotropin-releasing factor (CRF) e Serotonina (5-HT). Il controllo dell'introduzione di cibo risulterebbe dalla prevalenza ora dei fattori ad azione stimolante, ora dei fattori ad azione inibente che interagirebbero secondo un modello a cascata.

2.1. NEUROPEPTIDI IPOTALAMICI ORESSIGENICI

2.1.1. Neuropeptide Y (NPY)

L'NPY è un neuropeptide di 36 aminoacidi appartenente alla famiglia dei polipeptidi pancreatici, isolato per la prima volta da Tatemoto nel cervello di maiale (1982). E' uno dei neurotrasmettitori più abbondante ed ampiamente distribuito nell'intero Sistema Nervoso Centrale dei Mammiferi (Allen et al., 1983), sebbene il principale sito di produzione risulti essere il nucleo arcuato dell'ipotalamo (Morris B.J., 1989). I neuroni del nucleo arcuato sono in grado di proiettare alle diverse aree ipotalamiche ed a vari distretti cerebrali, anche se le fibre destinate ai nuclei paraventricolare e dorsomediale risultano essere quelle preminenti (Bai et al., 1985). A seguito di vari esperimenti condotti su animali da laboratorio, l'NPY è attualmente considerato il più potente stimolatore dell'appetito. Infatti, somministrazioni intracerebroventricolari (icv) ripetute di NPY nel PVN ipotalamico hanno determinato iperfagia ed un considerevole incremento del peso corporeo (Stanley et al., 1986).

L'attività dei neuroni dell'ARC sarebbe influenzata positivamente dal digiuno prolungato, da stati di dimagrimento e da perdite dei depositi adiposi, conseguenti a tutte le condizioni fisiologiche (lattazione) o patologiche (diabete insulino-dipendente) comportanti un deficit energetico (Frankish et al., 1995). In tali circostanze, infatti, i neuroni sarebbero stimolati da una caduta dei

livelli circolanti di insulina e/o leptina, a sintetizzare e rilasciare NPY nell'ARC (Schwartz et al., 2000).

L'espressione dell'NPY risulta incrementata anche in alcuni modelli animali di obesità genetica legata a difetti nella produzione o nel meccanismo d'azione della leptina (McKibbin et al., 1991; Wilding et al., 1993). Infatti, è ormai risaputo che i neuroni secernenti NPY sono il principale target d'azione della leptina e ciò giustifica, parzialmente, l'iperfagia osservabile negli stati caratterizzati da un deficit nel segnalamento della leptina (Schwartz et al., 1996).

Sebbene esistano diversi recettori in grado di legare l'NPY, l'Y₅ sembra essere verosimilmente il principale responsabile dell'azione oreosizzante di questo peptide (Schaffhauser et al., 1997).

2.1.2. Agouti-related protein (AgRP)

L'AgRP è un peptide di 132 aminoacidi elaborato esclusivamente nell'ipotalamo dagli stessi neuroni del nucleo arcuato che esprimono anche l'NPY (Broberger et al., 1998a). E' un potente antagonista endogeno dei recettori della melanocortina 3 e 4 (MC-3R, MC-4R) (Ollmann et al., 1997) ed è, perciò, in grado di stimolare l'assunzione di cibo inibendo l'azione dell' α -MSH a livello del recettore (Rossi et al., 1998). Infatti, è stato accertato che somministrazioni icv croniche di un frammento di AgRP a roditori determinano una marcata e prolungata iperfagia che conduce inevitabilmente

all'instaurarsi di un grave stato di obesità (Small et al., 2001). Quindi, l'azione oreosizzante dell'AgRP potrebbe essere correlabile sia all'attivazione dei recettori per l'NPY sia all'antagonismo nei confronti dei recettori per la melanocortina. Studi recenti, però, hanno dimostrato che somministrazioni ripetute nell'arco delle 24 ore di AgRP e precedenti a quelle di un'agonista della melanocortina, non sono sufficienti a bloccare gli effetti anoressigenici dell'agonista, facendo, così, presupporre l'intervento di meccanismi d'azione alternativi coinvolgenti, magari, i recettori per gli oppioidi o quelli per le orexine (Hagan et al., 2000; 2001; Zheng et al., 2002;).

2.1.3. Melanin-concentrating hormone (MCH)

L'MCH è un peptide ciclico isolato originariamente dalla ghiandola pituitaria di salmone (Kawauchi et al., 1983) e, successivamente, dall'ipotalamo di ratto e uomo (Vaughan et al., 1989; Mouri et al., 1993). Nei Pesci Teleostei esercita un forte controllo sulla pigmentazione cutanea sia attraverso la diretta aggregazione dei melanofori (Eberle A.N., 1988) sia mediante un'azione indiretta sul rilascio di α -MSH dalla ghiandola pituitaria (Baker B.I., 1991). Nei Mammiferi l'espressione di MCH è ristretta ai neuroni dell'area ipotalamica laterale e della zona incerta (ZI) (Naito et al., 1988), mentre le fibre a partenza da tali popolazioni cellulari sono ampiamente diffuse nell'intero SNC, giustificando così il ruolo di

neurotrasmettitore e di neruomodulatore in un'ampia varietà di attività fisiologiche, prima fra tutte la regolazione del comportamento ingestivo (Bittencourt et al., 1992). Infatti, al pari dell'NPY e dell'AgRP, l'MCH è un potente peptide oressizzante la cui espressione è incrementata da difetti nella produzione o nel meccanismo d'azione della leptina in modelli animali di obesità genetica (Mondal et al., 2002), dal digiuno (Qu et al., 1996) e dal trattamento con inibitori del metabolismo dei carboidrati e dell'ossidazione degli acidi grassi (Sergeyev et al., 2000).

2.1.4. Altri neurotrasmettitori oressizzanti

La **galanina (GAL)** è un neuropeptide di 29 aminoacidi ampiamente distribuito nel SNC, anche se le principali concentrazioni si rilevano a livello del PVN ipotalamico (Merchenthaler et al., 1993). Nei Mammiferi è coinvolto nel controllo della motilità gastrointestinale, del rilascio di insulina pancreatica e della stimolazione dell'appetito (Crawley J.N., 1995). Iniezioni icv ed ipotalamiche del peptide stimolano in soggetti a digiuno l'assunzione di cibo (Kyrkouli et al., 1990), seppure in maniera transitoria e sicuramente meno potente rispetto all'NPY, tanto è vero che somministrazioni ripetute non portano all'obesità (Smith et al., 1994). Tale effetto oressizzante sarebbe mediato da alcuni oppioidi endogeni

e dal rilascio di noradrenalina dal PVN (Horvarth et al., 1995; Kyrkouli et al., 1992) e sarebbe regolato dalla leptina (Sahu A., 1998).

Anche alcuni **peptidi oppioidi**, in particolare gli agonisti endogeni dei recettori κ , possono, in determinate condizioni, incrementare l'introito di cibo (Olson et al., 1994). La somministrazione prolungata di agonisti e di antagonisti degli oppioidi non determina sostanziali alterazioni nell'assunzione di cibo e nel peso corporeo, facendo supporre un meccanismo di controllo a breve termine dell'omeostasi energetica (Smith et al., 2002). Inoltre gli oppioidi sarebbero coinvolti nell'insorgenza di sensazioni di piacere e di ricompensa ("meccanismo edonico") conseguenti all'ingestione di cibi dolci, perciò potrebbero favorire l'assunzione di determinati alimenti particolarmente appetibili, a discapito di altri, portando all'obesità.

Negli ultimi anni, in seguito all'identificazione di specifici recettori (CB1) entro aree cerebrali coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi energetica, un certo ruolo nella regolazione del comportamento alimentare è stato assegnato anche al **sistema dei cannabinoidi** (Glass et al., 1997). I cannabinoidi, sia endogeni che esogeni, sono in grado di stimolare fortemente l'assunzione di cibo soprattutto negli stati di digiuno (Williams et al., 1998; Williams and Kirkham, 1999; Kirkham et al., 2002). Sebbene il meccanismo responsabile dell'iperfagia sia tutto ora parzialmente sconosciuto, si

suppone un coinvolgimento sia dei circuiti del piacere che dei pathway omeostatici, la maggior parte dei quali sono regolati dalla leptina ed operano all'interno dei nuclei ipotalamici (Fulton et al., 2000).

2.1.5. Orexine (ipocretina-1/orexina-A e ipocretina-2/orexina-B)

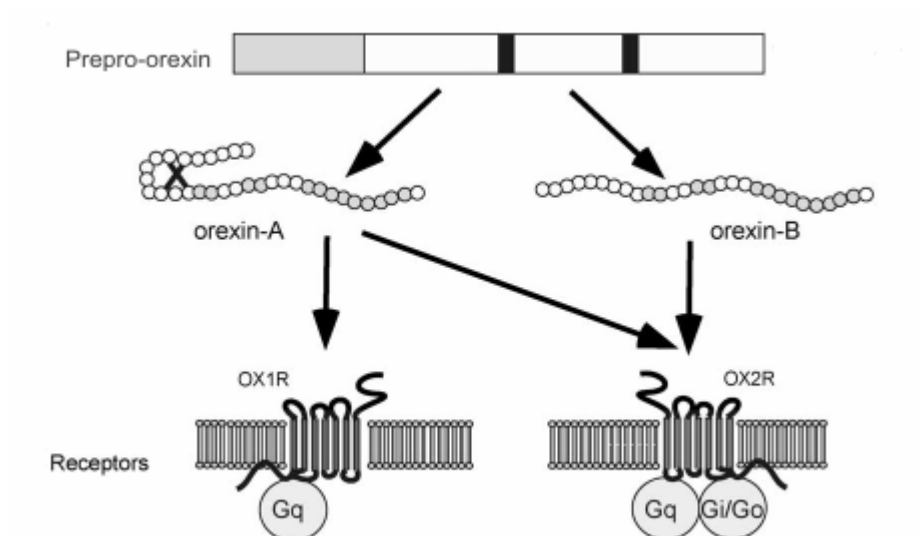
2.1.5.1. GENERALITÀ

L'orexina-A e l'orexina-B, denominate rispettivamente anche ipocretina-1 ed ipocretina-2, sono due neuropeptidi di recente identificazione sintetizzati principalmente da un piccolo gruppo di neuroni, distinti ma frapposti a quelli esprimenti MCH (Broberger et al., 1998b; Peyron et al., 1998), localizzati nell'area ipotalamica laterale (LH) e nel nucleo perifornicale dell'ipotalamo posteriore di ratto e dei primati, regioni classicamente coinvolte nella regolazione del comportamento alimentare (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Horvath et al., 1999). Queste popolazioni neuronali inviano molteplici proiezioni all'intero neuroasse ed, in particolare, alle diverse aree cerebrali coinvolte nell'omeostasi energetica, quali PVN, VMN e ARC (Peyron et al., 1998; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999). Il diffuso pattern di distribuzione fa presupporre un coinvolgimento del sistema delle orexine non solo nella modulazione centrale dell'assunzione di cibo e del peso corporeo, ma anche nella

regolazione di attività autonome e neuroendocrine (Hungs and Mignot, 2001).

2.1.5.2. STRUTTURA E RECETTORI

L'orexina-A consta di 33 aminoacidi e l'orexina-B di 28 aminoacidi, ma posseggono una sequenza omologa al 46% con una caratteristica amidazione C-terminale. Infatti, studi successivi hanno dimostrato che entrambi i peptidi derivano in seguito a differenti processi proteolitici da un singolo precursore, la prepro-orexina (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). L'espressione della prepro-orexina è influenzata positivamente nel digiuno prolungato (Sakurai et al., 1998), mentre risulta ridotta in due differenti modelli animali di obesità genetica, *ob/ob* e *db/db* (Yamamoto et al., 1999). Questo suggerisce che le orexine potrebbero agire da sistema regolatore negli stati di obesità. Tali peptidi, inoltre, legano ed attivano due specifici recettori ampiamente distribuiti nel SNC (Trivedi et al., 1998) ed appartenenti alla famiglia dei "G-protein-coupled receptors", il recettore-1 (OX1R) ed il recettore-2 (OX2R). Il primo è selettivo per l'orexina-A, il secondo lega entrambi i peptidi con simile affinità (Sakurai et al., 1998).



Rappresentazione schematica del sistema delle orexine.
Da Sakurai et al., 1998, modificato

2.1.5.3. EFFETTI BIOLOGICI

La caratteristica e ristretta localizzazione dei neuroni esprimenti le orexine nell'ipotalamo dorso-laterale ha suggerito l'eventuale coinvolgimento di questi peptidi nei meccanismi regolatori dell'assunzione di cibo e dell'omeostasi energetica. Sakurai et al. (1998) hanno dimostrato che somministrazioni icv sia di orexina-A che di orexina-B sono in grado di incrementare il consumo di cibo nei ratti, sebbene l'azione stimolante del secondo peptide sia di minore durata rispetto al primo. Verosimilmente, tale effetto orexizzante sarebbe il risultato di una complessa interazione tra le orexine e l'NPY, in cui però le prime svolgerebbero un ruolo di primaria importanza (Horvarth et al., 1999). I neuroni dell'ARC sintetizzanti

NPY/AgRP innervano i neuroni ad orexina esprimenti a loro volta i recettori Y_1 e Y_5 per l'NPY (Dube et al., 2000; Jain et al., 2000); allo stesso tempo, i neuroni dell'NPY/AgRP ricevono degli input dai neuroni ad orexina (Horvarth et al., 1999). Infatti, soprattutto l'orexina-A stimola l'espressione Fos (un marker di attivazione neuronale) nei neuroni dell'NPY (Yamanaka et al., 2000) ed accentua quindi l'azione anabolica di tale peptide (Sahu A., 2002), mentre anche l'NPY attiva i neuroni ad orexina nell'LHA, probabilmente attraverso il legame con il recettore Y_1 o Y_5 (Dube et al., 2000; Jain et al., 2000; Yamanaka et al., 2000). Inciderebbero sull'azione anabolica delle orexine anche i livelli plasmatici di glucosio e di leptina. Circa il 30% dei neuroni dell'LHA risulta eccezionalmente sensibile alle concentrazioni di glucosio (Moriguchi et al., 1999) e quasi il 50% esprime il recettore per la leptina (Sakurai T., 1999). Perciò, sia negli stati ipoglicemici che nel digiuno prolungato, in cui aumentano i segnali di adiposità, l'espressione ed i livelli di tali peptidi nell'ipotalamo laterale sono notevolmente incrementati.

Le altre attività fisiologiche in cui è stato supposto un intervento delle orexine comprendono l'assunzione di acqua (Kunii et al., 1999), il ciclo del sonno e della veglia (Sutcliffe and de Lecea., 2000), il ritmo cardiaco e le resistenze vascolari (Samson et al., 1999; Chen et al., 2000), la secrezione acida e la motilità gastrointestinale (Takahashi et al., 1999; Krowicki et al., 2002; Naslund et al., 2002),

la secrezione pancreatica esocrina ed endocrina (Miyasaka et al., 2002; Ouedrago et al., 2003), nonché il rilascio dell'ormone luteinizzante (LH) (Pu et al., 1998), dell'ormone della crescita (GH) (Seoane et al., 2004) e della prolattina (Russell et al., 2000).

2.2. NEUROPEPTIDI IPOTALAMICI ANORESSIGENICI

2.2.1. *Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)*

L'α-MSH, prodotto di clivaggio del gene della pro-opiomelanocortina (POMC) ampiamente distribuito nell'intero ipotalamo dei Mammiferi (Jacobowitz and O'Donohue, 1978), modula l'omeostasi energetica inibendo fortemente l'assunzione di cibo, mediante il legame con due specifici recettori, l'MC3-R e l'MC4-R (Kalra et al., 1999; Cone R.D., 1999). Dal principale sito di produzione, il nucleo arcuato, l'α-MSH è rilasciato dagli assoni terminali nelle aree cerebrali coinvolte nel meccanismo di controllo del comportamento alimentare, ossia nel PVN, VMH, DMN e nei nuclei della zona mediale dell'ipotalamo, ove si lega ed attiva, in particolare, l'MC4-R che sembrerebbe svolgere un ruolo principale nell'azione anoressizzante dell'α-MSH (Mountjoy et al., 1994; Harrold et al., 1999). Il grado di attivazione dell'MC4-R, e quindi l'influenza esercitata sull'omeostasi energetica, è correlabile all'equilibrio tra l'α-MSH e il suo antagonista endogeno, l'AgRP (Ollmann et al., 1997). Ad

esempio, la scomparsa dell'MC4-R determina nei topi l'insorgenza di iperfagia, iperinsulinemia, iperglicemia ed obesità (Huszar et al., 1997). Allo stesso modo, la somministrazione icv di un potente antagonista dell'MC4-R stimola fortemente l'ingestione di cibo (Rossi et al., 1998) ed in presenza di una mutazione dominante della proteina agouti, omologa all'AgRP e perciò in grado di antagonizzare i recettori centrali della melanocortina (Marsh et al., 1999), i topi sviluppano una forte iperfagia con conseguente obesità (Moussa and Claycombe, 1999). Quindi, in tutti gli stati caratterizzati da un digiuno prolungato (Brady et al., 1990; Bergendahl et al., 1992) o da deficienze genetiche di leptina (Mizuno et al., 1997), l'espressione del POMC ed i livelli di peptide nel nucleo arcuato sono decisamente ridotti; al contrario, l'espressione del POMC è stimolata nelle condizioni di iperalimentazione (Hagan et al., 1999) e a seguito di iniezioni di leptina (Schwartz et al., 1997).

2.2.2. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)

Il CART, un peptide di recente generazione, è stato identificato per la prima volta nello striato di ratto grazie a metodiche di PCR differenziali, conseguenti a somministrazioni di cocaina ed anfetamina (Douglass et al., 1995). E' ampiamente distribuito nel SNC (Couceyro et al., 1997), e concentrazioni relativamente elevate

sono state rinvenute nel PVN e nell'ARC, negli stessi neuroni che esprimono l' α -MSH (Kristensen et al., 1998). Data la localizzazione del CART nelle suddette aree ipotalamiche, si è dedotto che anche questo peptide è coinvolto nei complessi meccanismi che regolano il comportamento alimentare, agendo, in particolare, da molecola anoressizzante (Kristensen et al., 1998; Kuhar and Dal Vechia, 1999). Infatti, somministrazioni icv di CART inibiscono l'assunzione di cibo sia in ratti normalmente alimentati che in soggetti in cui l'ingestione di cibo è stata stimolata dall'NPY (Kristensen et al., 1998; Vrang et al., 1999). Anche l'espressione del CART è regolata positivamente dalla leptina (Thim et al., 1998). Infatti, nei periodi di digiuno prolungati e nei roditori geneticamente obesi (ob/ob), condizioni in cui quindi i segnali della leptina sono fortemente ridotti, se non addirittura assenti, l'espressione del CART nel nucleo arcuato è quasi inesistente; sono però sufficienti delle somministrazioni periferiche di leptina esogena per ripristinare i livelli del peptide in questione (Kristensen et al., 1998).

2.2.3. Corticotropin-releasing factor (CRF)

Il CRF, isolato e sequenziato per la prima volta nel 1981, è l'unico peptide ipotalamico in grado di stimolare il rilascio di ACTH dalla ghiandola pituitaria anteriore (Vale et al., 1981). Oltre ad influenzare la secrezione di corticosteroidi a livello surrenalico e

mediare quindi gli aspetti comportamentali legati a situazioni stressanti, il CRF è anche coinvolto nella regolazione dell'assunzione di cibo, essendo principalmente sintetizzato a livello del PVN ipotalamico, riconosciuto come "centro di sazietà" (Morley and Levine, 1982; Monnikes et al., 1992). Infatti, iniezioni intraventricolari, nonché microiniezioni di CRF nel PVN, influenzano negativamente sia il comportamento alimentare, determinando anoressia, che il bilancio energetico mediante il legame con recettori ad alta affinità distribuiti in varie regioni del cervello, ma particolarmente concentrati nel PVN (Perrin et al., 1993; Lovenberg et al., 1995). Come per gli altri effettori catabolici, la sintesi neuronale di CRF è fortemente ridotta nel digiuno prolungato ed incrementata, al contrario, in tutte le condizioni caratterizzate da un aumento dei segnali di adiposità (insulina e leptina) nel cervello (Schwartz et al., 2000).

2.2.4. Serotonina (5-HT)

Anche la serotonina si comporta da neurotrasmettitore catabolico riducendo l'assunzione di cibo ed incrementando il dispendio energetico (Curzon G., 1990), soprattutto attraverso il recettore 5-HT_{2c} altamente concentrato nell'ipotalamo ventro-mediale (Simansky K.J., 1996; Curzon et al., 1997). In particolare, le vie serotoninergiche sarebbero coinvolte nel controllo di specifici comportamenti alimentari quali la quantità totale, la durata e la

frequenza dei pasti individuali, determinando un'insorgenza precoce del segnale di sazietà (Blundell J.E., 1984; 1986; Leibowitz et al., 1988). Inoltre, la stimolazione serotoninergica da parte della 5-HT o di suoi agonisti ha ripercussioni anche sul metabolismo energetico, in quanto esalta l'ossidazione lipidica e riduce l'ossidazione dei glucidi, inibendo con un meccanismo di feed-back negativo, l'ingestione di altri carboidrati (Boschmann et al., 1996).

Tabella riassuntiva dei Neuropeptidi ipotalamici coinvolti nel controllo dell'omeostasi energetica

Da Mercer e Speakman, 2001, modificato

Peptide	Acronym	Relevant site(s) of synthesis
Anabolic/orexigenic		
Neuropeptide Y	NPY	Arcuate nucleus (ARC)
Agouti-related protein	AGRP	ARC
Melanin-concentrating hormone	MCH	Lateral hypothalamus (LHA)
Orexins (hypocretins)	-	LHA
Galanin	-	Paraventricular nucleus (PVN)
Catabolic/anorexigenic		
Alpha-melanocyte-stimulating hormone	alpha-MSH	ARC
Cocaine- and amphetamine-regulated transcript	CART	ARC, other hypothalamic sites?
Corticotrophin-releasing factor	CRF	PVN
Glucagon-like peptide-1	GLP-1	Nucleus tractus solitarius (NTS)
Glucagon-like peptide-2	GLP-2	NTS

CAPITOLO 3.

SISTEMA PERIFERICO “A LUNGO TERMINE”

Recenti dati clinici e sperimentali hanno dimostrato che il tessuto adiposo da un punto di vista funzionale è molto più complesso di quanto si riteneva sino a pochi anni or sono, quando veniva considerato un mero e semplice deposito di grassi e di energia metabolicamente inerte. E' stata, infatti, ben documentata in questa sede una produzione autonoma di diversi fattori di notevole rilevanza nella regolazione di numerose funzioni endocrine, tanto che gli è valso il nome di “organo adiposo”. Di tutti questi fattori ha suscitato notevole interesse, sin dalla sua scoperta, la leptina.

3.1. LEPTINA

3.1.1. GENERALITÀ

Identificata per la prima volta nel 1994, a seguito di clonazioni posizionali, come il prodotto del gene ob (Zhang et al., 1994), la leptina (dal Greco “leptos” che significa “magro”) funziona principalmente da molecola segnale che, in relazione ai depositi di grasso ed allo stato nutrizionale dell'organismo, limita a livello centrale l'assunzione di cibo ed aumenta il dispendio energetico

dell'organismo, svolgendo quindi un ruolo chiave nel mantenimento di un peso corporeo stabile. Difatti, mutazioni genetiche nell'espressione di tale proteina (*ob*) o del suo recettore determinano l'insorgenza di obesità ed infertilità nei roditori *ob/ob* (Zhang et al., 1994). Proprio per questa ragione, con gli anni, è maturato un considerevole interesse sull'uso potenziale di questo ormone non solo per il trattamento dei disordini alimentari dell'uomo (obesità, diabete ed anoressia nervosa), ma anche per l'ottimizzazione delle produzioni zootecniche, investigando a fondo i suoi effetti sul metabolismo e sul comportamento alimentare degli animali.

3.1.2. STRUTTURA E SINTESI

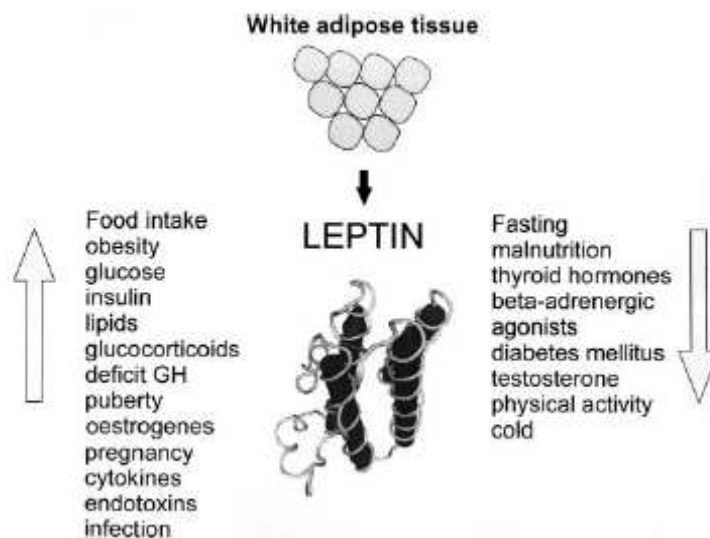
La leptina dei Mammiferi è un ormone proteico di 167 aminoacidi con una sequenza segnale secretoria di 21 aminoacidi. La traslocazione della leptina all'interno dei microsomi è seguita dalla rimozione della sequenza segnale e dalla successiva immissione nel circolo sanguigno della proteina. La leptina circolante è un peptide di 146 aminoacidi con un peso molecolare approssimativo di 14-16 kDa (Zhang et al., 1994; Considine and Caro, 1997). Analisi strutturali hanno rivelato una certa correlazione con alcuni membri della famiglia delle citochine (Madej et al., 1995; Zhang et al., 1997) ed un alto grado di conservazione tra le specie fino ad oggi esaminate. Per esempio, la leptina umana risulta omologa per l'84% e l'83% a quella

di topo e ratto, rispettivamente (Zhang et al., 1994), e per l'85% a quelle di bovino e maiale (Doyon et al., 2001), facendo quindi supporre che tale peptide possa svolgere simili funzioni o agire secondo un comune meccanismo d'azione nelle varie specie.

Il tessuto adiposo bianco è stato considerato per diverso tempo il sito esclusivo di produzione di leptina nei Mammiferi (Maffei et al., 1995; Leroy et al., 1996); successivamente ne è stata accertata la sintesi anche in diversi e molteplici tessuti periferici, quali il tratto gastrointestinale (Bado et al., 1998), il muscolo scheletrico (Wang et al., 1998), la placenta (Masuzaki et al., 1997), la ghiandola mammaria (Smith-Kirwin et al., 1998), l'ipotalamo (Morash et al., 1999) e l'ipofisi (Jin et al., 2000). Studi di immunoistochimica e di *ibridizzazione in situ* condotti su roditori gravidi hanno dimostrato la sintesi di leptina in diverse regioni del feto incluso cuore, ossa, cartilagine e cellule del follicolo pilifero; questi stessi tessuti non si sono, però, rivelati fonti di leptina negli individui adulti, facendo supporre che tale proteina possa fungere da fattore di crescita o da fattore regolatore del processo di ematopoiesi nel feto (Hoggard et al., 1997; 1998).

L'espressione e la secrezione della leptina sono strettamente correlate alla massa grassa corporea ed alle dimensioni degli adipociti, e sono regolate da molteplici fattori genetici, metabolici ed endocrini. Infatti, a parità di depositi di grasso, le femmine sembrano

sintetizzare più leptina rispetto ai maschi (Frederich et al., 1995). Inoltre, la produzione di questo ormone sarebbe stimolata, negli stati di obesità, dalle concentrazioni di insulina (Saladin et al., 1995), di glucocorticoidi (Sliker et al., 1996), di citochine ed endotossine (Grunfeld et al., 1996), di glucosio, lipidi ed estrogeni (Wang et al., 1998), mentre al contrario, sarebbe inibita dal digiuno prolungato, dal freddo, dall'attività fisica, dal testosterone (Castracane et al., 1998), dagli ormoni tiroidei (Escobar-Morreale et al., 1997) e dagli agonisti β -adrenergici (Li et al., 1997).



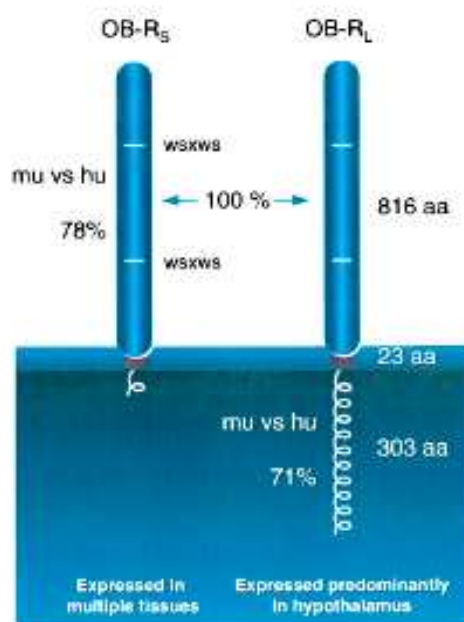
Fattori coinvolti nella sintesi di leptina da parte del tessuto adiposo bianco.
da Macajova et al., 2004

3.1.3. RECETTORI PER LA LEPTINA (OB-R)

Gli effetti biologici della leptina sono mediati da specifici recettori localizzati sulle membrane citoplasmatiche delle cellule degli organi bersaglio. Fino ad oggi è stato clonato nei Mammiferi un unico recettore per la leptina (Ob-Rb), di cui sono state individuate almeno cinque varianti: Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re e Ob-Rf (Tartaglia et al., 1995; Tartaglia L.A., 1997). Tutte le isoforme presentano lo stesso dominio di legame extracellulare per la leptina in corrispondenza del terminale “amino”, ma differiscono a livello del terminale carbossilico. Mentre le varie isoforme sono considerate recettori “short-form”, l’Ob-Rb è il solo recettore “long-form”, contenente cioè un lungo dominio intracellulare di circa 300 aminoacidi, altamente omologo al dominio del recettore delle citochine di tipo I ed in grado, perciò, verosimilmente, di funzionare attraverso i segnali di traduzione del JAK/STAT (Bjorbaek et al., 1997). Una o più varianti sono espresse nella maggior parte, se non in tutti i tessuti bersaglio. Quelle degne di particolare interesse sono l’Ob-Ra, l’Ob-Rb e l’Ob-Re, dal momento che le altre isoforme sono espresse solo a basse concentrazioni (Fei et al., 1997). L’Ob-Ra, è altamente concentrato nei capillari sanguigni del cervello e nel plesso corioideo del ratto, perciò fungerebbe per lo più da trasportatore di leptina, favorendone il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica (Bjorbaek et al., 1998). L’Ob-Rb, invece, è principalmente localizzato in specifiche aree del cervello, in

particolare a livello ipotalamico (Elmquist et al., 1998b), ma è particolarmente diffuso anche in un'ampia varietà di tessuti periferici, quali ovaie, testicoli, placenta, midollare del surrene, fegato, cellule β del pancreas, reni, intestino, cuore, muscoli scheletrici e tessuto adiposo (De Matteis et al., 1998). In virtù di questo pattern di distribuzione, l'Ob-Rb sembrerebbe mediare gli effetti della leptina sul comportamento alimentare, sul bilancio energetico e sul metabolismo. L'Ob-Re è presente in circolo sotto forma di proteina di legame solubile (Friedman and Halaas, 1998), perciò non parteciperebbe attivamente all'invio dei segnali di adiposità, ma, probabilmente, è fondamentale nel determinismo dei livelli di leptina presenti nel circolo sistemico (Huang et al., 2001).

Recettori per la leptina, OB-R,
 "short" e "long" form.
 Da Tartaglia et al., 1997

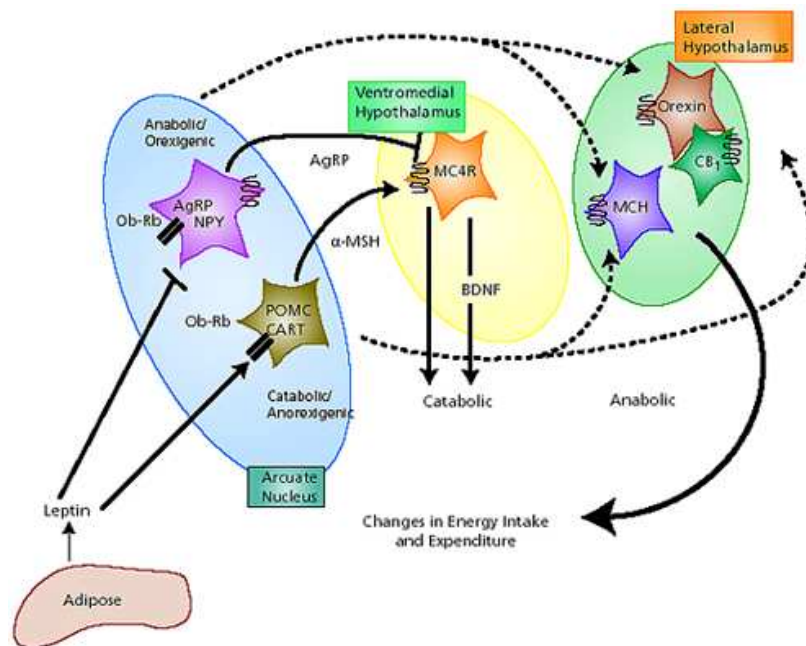


3.1.4. EFFETTI BIOLOGICI

La leptina è principalmente coinvolta nella regolazione del comportamento alimentare, dell'omeostasi energetica e del peso corporeo (Woods et al., 1998; Schwartz et al., 1999). Funge, infatti, da segnale di adiposità inviando al cervello informazioni inerenti lo stato metabolico dell'organismo. Studi condotti sui roditori hanno chiaramente evidenziato che restrizioni caloriche e perdite di peso esitano in un rapido declino dei livelli di leptina circolante con conseguente riduzione dell'appetito ed aumento del dispendio energetico (Frederich et al., 1995; Ahima et al., 1996; Considine and Caro, 1997). Lo stesso effetto è stato osservato anche in animali geneticamente obesi, *ob/ob*, a seguito di somministrazioni icv giornaliere di leptina ricombinante (Campfield et al., 1995; Haalas et al., 1995; Pellemounter et al., 1995). L'efficacia della leptina di inibire l'assunzione di cibo quando è somministrata nel SNC di roditori dimostra chiaramente che il cervello è un importante sito d'azione di questo ormone per la regolazione del bilancio energetico.

A livello centrale i principali targets leptinici, esponenti cioè il recettore Ob-Rb (Schwartz et al., 1996), sono i neuroni dei nuclei arcuato, ventromediale e dorsomediale dell'ipotalamo ed i circuiti neuronali del tronco encefalico (Elmqvist et al., 1997; 1998a). In tali regioni le popolazioni neuronali sensibili alla leptina esprimono neuropeptidi/neurotrasmettitori coinvolti nella regolazione centrale

dell'omeostasi energetica. In particolare, il recettore Ob-Rb è co-espresso con l'NPY e con l'AgRP nel nucleo arcuato mediale (Baskin et al., 1999), e con l' α -MSH (prodotto dal POMC) ed il CART nel nucleo arcuato laterale (Cheung et al., 1997). Quindi, elevate concentrazioni di leptina riducono l'assunzione di cibo agendo direttamente sui neuroni dell'ARC, inibendo la sintesi di NPY/AgRP (Wang et al., 1997) e stimolando la produzione di α -MSH e del CART (Schwartz et al., 1997).



Azione centrale della leptina sull'omeostasi energetica

Oltre ad influenzare il comportamento alimentare, queste stesse popolazioni neuronali sembrerebbero mediare, attraverso le multiple proiezioni dirette al PVN ipotalamico (Sawchenko P.E., 1998;

Elmquist et al., 1999), alcune delle funzioni neuroendocrine della leptina, quali la secrezione dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRh), dell'ormone follicolo-stimolante (FSH), dell'ormone luteinizzante (LH) e dell'ormone della crescita (GH) dalla ghiandola pituitaria anteriore, con conseguenti ripercussioni anche sulla sfera riproduttiva e sull'accrescimento (Yu et al., 1997; Hoggard et al., 1998; McCann et al., 1998; Tannenbaum et al., 1998). Che la leptina sia necessaria e indispensabile per la maturazione dell'asse riproduttivo è stato evidenziato da diversi studi. Infatti, soggetti adulti con una mutazione a carico del gene codificante per *ob* sono ipogonadici (Strobel et al., 1998) e, allo stesso tempo, somministrazioni esogene di leptina ricombinante nei topi geneticamente obesi (*ob/ob*) e quindi sterili, attivano l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi ripristinando lo stato di fertilità e la pubertà (Chehab et al., 1996).

Indipendentemente dal suo ruolo nella regolazione a lungo termine del peso corporeo, la leptina influenza le fasi acute di diversi aspetti metabolici, inibendo, la sintesi di insulina da parte delle cellule β del pancreas (Fehmann et al., 1997), stimolando la gluconeogenesi e l'utilizzazione del glucosio (Kamohara et al., 1997; Rossetti et al., 1997), incrementando la sintesi di acidi grassi a livello epatico (Cohen et al., 1998), stimolando la lipolisi negli adipociti (Frühbeck et al., 1997). Infine, è da considerare un'azione

modulatrice della leptina anche nel processo di ematopoiesi (Gainsford et al., 1996) e nelle risposte immunitarie (Lord et al., 1998).

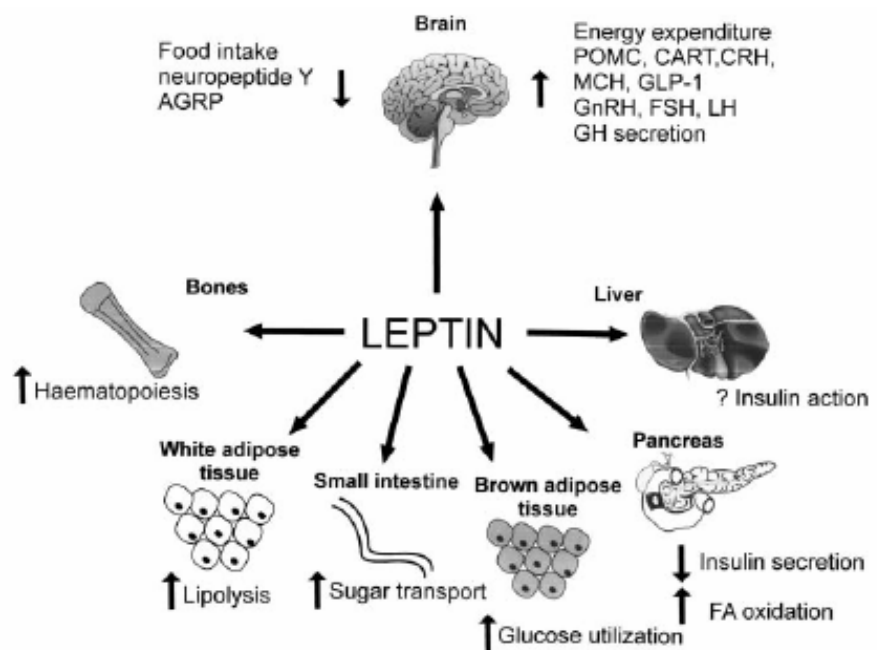


Illustrazione schematica delle azioni centrali e periferiche della leptina.
Da Macajova et al., 2004

CAPITOLO 4.

SISTEMA PERIFERICO “A BREVE TERMINE”

Del “sistema periferico della sazietà” fanno parte tutti quei fattori correlati al momento del pasto e responsabili di un cambiamento acuto del bilancio energetico, in maniera del tutto indipendente rispetto allo stato dei depositi adiposi dell’organismo. Questo gruppo racchiude un’ampia varietà di stimoli sia esogeni che endogeni che vanno dai segnali fisiologici generatisi in risposta al consumo di cibo, alle risposte autonome e comportamentali conseguenti a stress ambientali, in grado di influenzare, per lo più, le dimensioni dei pasti ed i successivi consumi. Qualora, però, tali segnali a breve termine si prolungassero oltre il tempo dovuto, finirebbero con l’influenzare anche il livello di adiposità e quindi il peso corporeo. Questo è particolarmente vero per i fattori emozionali e per i cambiamenti nella composizione della dieta.

Sulla base di questi presupposti è chiaro che il tratto gastrointestinale (stomaco, piccolo e grosso intestino) partecipa attivamente alla regolazione dell’omeostasi energetica, essendo fonte di molecole segnali a breve termine, come ormoni e nutrienti, in grado di stimolare od inibire (nella quasi totalità dei casi) l’assunzione di cibo a livello centrale.

Sono due i principali meccanismi tramite i quali il sistema digestivo controlla l'appetito: attraverso le afferenze vagali o grazie ad un'azione diretta sulle aree ipotalamiche coinvolte nel comportamento alimentare.

4.1. NUTRIENTI

L'efficienza saziante degli alimenti si esplica attraverso processi diversi che nascono dall'interazione dell'alimento stesso con meccanismi fisiologici e biochimici. Da questa interazione hanno poi origine segnali nervosi ed ormonali che partecipano al controllo dell'appetito. I processi in gioco possono essere distinti fondamentalmente in post-ingestivi (quando gli alimenti vengono deglutiti e arrivano al tratto gastroenterico) e post-assorbitivi (quando i nutrienti digeriti entrano nel circolo sistemico). Pervenuti nel tratto gastrointestinale, i cibi ingeriti stimolano, per le loro caratteristiche organolettiche, meccanorecettori e chemiorecettori localizzati sulla superficie luminale degli enterociti, che attraverso il nervo vago trasmettono informazioni al SNC. Di conseguenza, un elevato contenuto intestinale di nutrienti, avrà ripercussioni anche sullo stomaco, riducendone il grado di riempimento e prolungando così ulteriormente la distensione gastrica post-prandiale. Questo tipo di informazioni costituisce la prima classe di segnali che agisce sul

sistema nervoso centrale e fa parte del controllo post-ingestivo (Powley T., 1977; Mei N., 1985). Nella fase post-assorbitiva i nutrienti derivanti dai processi digestivi, attraverso il circolo sistemico, vengono trasportati ai vari tessuti periferici compreso quello nervoso. Tali molecole costituiscono una seconda classe di segnali metabolici, tra cui entrano a far parte il glucosio, gli acidi grassi liberi ed alcuni aminoacidi essenziali come il triptofano e la tirosina (Friedman et al., 1986).

Quasi cinquanta anni fa Mayer (1953) fu il primo ad avanzare l'ipotesi, recentemente rivisitata e rivista (Bray G.A., 1996), che uno stato di ipoglicemia od un blocco nel metabolismo del glucosio potesse far insorgere una sensazione di fame e, di conseguenza, stimolare l'assunzione di cibo. Infatti, nel 1969 Oomura et al. hanno riportato che alcune popolazioni neuronali nell'ipotalamo ventromediale e laterale incrementavano le proprie attività dopo trattamento con il glucosio. Ma i neuroni non sono le uniche popolazioni cellulari sensibili alle concentrazioni di glucosio ematico ed in grado quindi di intervenire sulla regolazione dell'ingestione di cibo. Anche le cellule epatiche, infatti, sono in grado di rilevare gli stati ipoglicemici ed inviare impulsi al SNC attraverso afferenze vagali (Novin et al., 1973). Sembra che questo tipo di meccanismo sia valido anche per i prodotti derivati dall'ossidazione degli acidi grassi che si realizza sempre nelle cellule epatiche. Infatti, una inibizione del

metabolismo lipidico a livello epatico sembrerebbe incrementare l'espressione di un neuropeptide ad azione oressizzante nell'ipotalamo laterale, stimolando di conseguenza l'appetito (Friedman et al., 1999). Oltre al glucosio e agli acidi grassi, anche le proteine, e soprattutto alcuni aminoacidi, sembrano influenzare il comportamento alimentare. In particolare, il triptofano, diretto precursore della serotonina cerebrale in grado di esercitare una influenza inibitoria sull'assunzione di cibo (Fernstrom and Wurtman, 1971), è riconosciuto come principale fattore ipotalamico anoressizzante. Esso è trasportato nel sangue legato all'albumina plasmatica, la cui concentrazione è a sua volta modulata dal tasso di insulina circolante, capace di liberarla dal legame con gli acidi grassi e di renderla disponibile al legame con il triptofano. Ne deriva un ruolo diretto dell'insulina sulla capacità di mobilitazione tissutale di triptofano e quindi sulle concentrazioni ipotalamiche di serotonina (Morley J.E., 1990). Un secondo aminoacido essenziale, la tirosina, riveste altresì un ruolo fondamentale nella regolazione dell'equilibrio poiché è il diretto precursore della noradrenalina e dell'adrenalina oltre che della dopamina cerebrale (Morley J.E., 1990). Per quanto riguarda le catecolamine, è stato osservato che la stimolazione adrenergica da parte di noradrenalina e adrenalina provoca assunzione di cibo quando si verifica a livello del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; mentre sia l'adrenalina che la

noradrenalina, insieme alla dopamina, esercitano un'azione di tipo anoressizzante quando agiscono a livello dei recettori adrenergici e dopaminergici localizzati nell'area ipotalamica laterale.

Da tali dati si comprende, quindi, come diversi fattori in grado di agire su questi sistemi di neurotrasmissione, attivandoli o inibendoli, interferiscano nella regolazione del comportamento alimentare, nelle dimensioni dei pasti, nella scelta dei nutrienti e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi energetica e del peso corporeo.

4.2. PEPTIDI GASTROINTESTINALI

Diversi peptidi, originariamente evidenziati esclusivamente nei centri regolatori dell'appetito del SNC, sono stati riscontrati successivamente anche nel tratto gastrointestinale, mettendo così in risalto il ruolo di questo distretto anatomico nei meccanismi regolatori del comportamento alimentare. E' questo il caso dell'NPY, del glucagon-like peptide-1 (GLP-1), del glucagon-like peptide-2 (GLP-2), della colecistochinina (CCK), della bombesina, delle orexine e della grelina. Con la sola eccezione della grelina, un peptide oressizzante di recente identificazione, tutti gli altri ormoni si comportano da "segnali di sazietà", in quanto inibiscono uniformemente l'assunzione di cibo. I peptidi regolatori che finora hanno ricevuto particolare attenzione

sono la CCK e la bombesina. Negli ultimi anni le sostanze che hanno suscitato maggiore interesse sono glucagon-like peptide-1 (GLP-1), la grelina e le orexine.

4.2.1. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

4.2.1.1. GENERALITÀ

Le “incretine” sono ormoni peptidici di derivazione intestinale rilasciati in seguito alla presenza di nutrienti nel tratto digestivo ed in grado di potenziare la secrezione insulinica post-prandiale attraverso l’attivazione dell’asse entero-insulare. Nell’uomo e negli animali, la più potente incretina secreta al termine del pasto è il glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Kreymann et al., 1987). Oltre a stimolare il rilascio di insulina dalle cellule β del pancreas, il GLP-1 è responsabile di una serie di effetti biologici, come il rallentamento dello svuotamento gastrico, l’inibizione della secrezione acida dello stomaco e l’aumento del senso di sazietà che incidono fortemente sui meccanismi di controllo centrale dell’appetito (Turton et al., 1996).

4.2.1.2. STRUTTURA E SINTESI

Dalla molecola precursore di pro-glucagone grazie a differenti processi proteolitici di clivaggio guidati dai vari tessuti di origine (Dhanvantari et al., 1996), si ottengono, oltre al glucagone sintetizzato nelle cellule α del pancreas endocrino (Lefebvre P.J.,

1999), altri due peptidi strettamente correlati, denominati glucagon-like peptide-1 (GLP-1) e glucagon-like peptide-2 (GLP-2) di principale derivazione intestinale (Holst J.J., 1997). In particolare, il GLP-1 è un ormone proteico sintetizzato principalmente in cellule enteroendocrine specializzate (cellule L) del piccolo e grosso intestino, localizzate soprattutto a livello dell'ileo distale e del colon (Drucker D.J., 1998) e secreto in seguito alla presenza di nutrienti nel lume intestinale, principalmente grassi e carboidrati (Elliott et al., 1993; Roberge and Brubaker, 1993). In tale sede è possibile rinvenire due distinte forme molecolari di GLP-1: il GLP-1 (7-36)amide e il GLP-1 (7-37)amide (Holst J.J., 1999). Sono entrambe attive biologicamente, ma in circolo si rinvenivano maggiori concentrazioni del GLP-1 (7-36)amide (Holst J.J., 1999). Comunque, nel giro di pochi minuti dalla immissione in circolo i livelli di GLP-1 plasmatico sono drasticamente ridotti, per la degradazione operata dall'enzima dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) nelle due forme troncate ed inattive, rispettivamente il GLP-1 (9-36) ed il GLP-1 (9-37) (Kieffer et al., 1995).

Oltre che nell'intestino il GLP-1 è sintetizzato anche in alcuni distretti del SNC. In particolare, nel cervello di ratto il GLP-1 è stato localizzato nella porzione caudale del tratto solitario e nelle porzioni dorsali e ventrali del nucleo reticolare della medulla, ossia in quelle regioni che ricevono afferenze dal tratto gastrointestinale attraverso il nervo vago (Jin et al., 1988). Fibre positive sono state rinvenute,

invece, in alcuni nuclei dell'ipotalamo, del talamo e nel tronco encefalico (Jin et al., 1988; Kanse et al., 1988; Kreymann et al., 1989).

Gli effetti biologici del GLP-1 sono mediati da un unico e specifico recettore appartenente alla famiglia dei "G-protein-coupled receptor", indicato come GLP-1R, ampiamente distribuito nel SNC (Alvarez et al., 1996), nell'intero tratto gastrointestinale (Lankat-Buttgereit et al., 1994), negli isolotti pancreatici, nel cuore, nel rene, nei muscoli scheletrici e nel tessuto adiposo (Valverde et al., 1993; Bullock et al., 1996). I principali siti di legame del GLP-1 sono stati rinvenuti nell'organo subfornicale e nell'area postrema (Johnson and Gross, 1993; Goke et al., 1995). Dal momento che gli organi circumventricolari sono privi della barriera ematoencefalica perivascolare, c'è la possibilità che si realizzi un libero scambio di molecole tra sangue e liquido cerebrospinale (Johnson and Gross, 1993, Goke et al., 1995).

4.2.1.3. EFFETTI BIOLOGICI

Il GLP-1 esercita molteplici ed importanti effetti biologici sull'attività pancreatica, sulle funzioni gastrointestinali e sul comportamento alimentare.

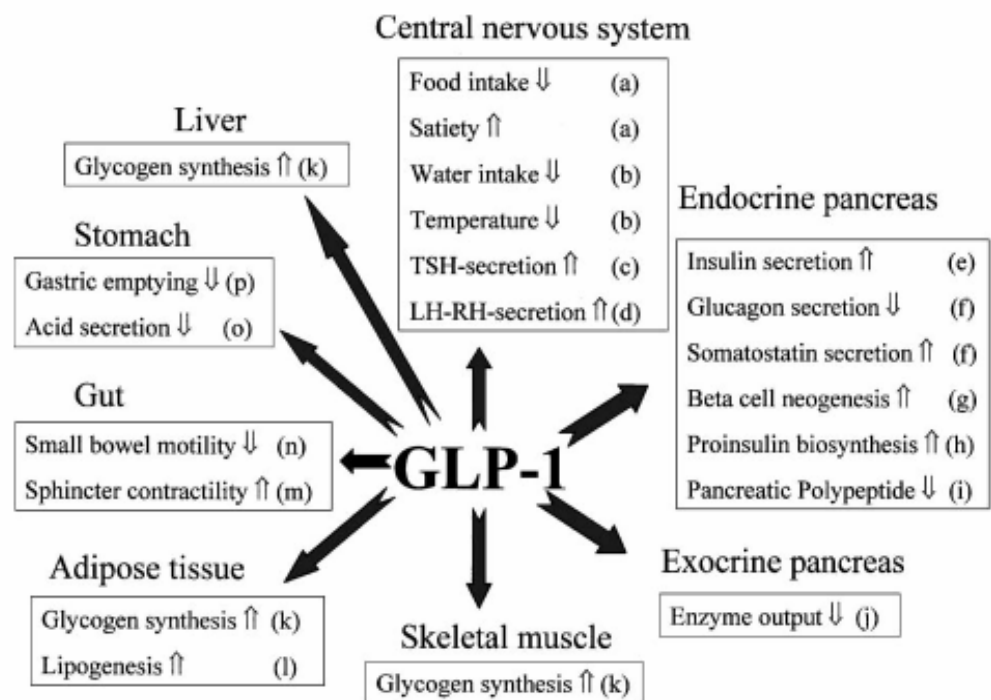
A concentrazioni plasmatiche fisiologiche il GLP-1 risulta essere il più potente stimolo peptidergico per la sintesi ed il rilascio di

insulina da parte delle cellule β del pancreas, essendo il suo effetto glucosio-dipendente: più alti sono i livelli plasmatici di glucosio, maggiore sarà la produzione di insulina (Kreymann et al., 1987). Ovviamente l'immissione in circolo di insulina ha ripercussioni sul metabolismo dei carboidrati in quanto riduce il tasso ematico di glucosio e, di conseguenza, inibisce il rilascio di glucagone (Ørskov C., 1992; Ritzel et al., 1995).

Nel tratto gastrointestinale il GLP-1 inibisce la secrezione acida dello stomaco e rallenta lo svuotamento gastrico, in caso di pasti solidi e liquidi (Wettergren et al., 1993; Naslund et al., 1999), con un meccanismo che sembra coinvolgere, sia nell'uomo che negli animali, le afferenze vagali (Imeryüz et al., 1997; Wettergren et al., 1997). Probabilmente, il GLP-1 interagisce con le afferenze vagali localizzate nella sottomucosa ed esprime il GLP-1R nello stesso modo in cui la colecistochinina modula lo svuotamento gastrico (Thompson D.G., 2000).

Il GLP-1 svolge un'importante azione anche sulla regolazione centrale del comportamento alimentare. Infatti, iniezioni icv di GLP-1 inibiscono l'assunzione di acqua e cibo in roditori (Turton et al., 1996; McMahon and Wellman, 1998) ed incrementano l'espressione del gene *c-fos* nel nucleo paraventricolare (Turton et al., 1996), mentre somministrazioni icv di un antagonista del GLP-1R, come l'exendina (9-39)amide, a ratti sazi ma non digiuni, determinano un

significativo incremento sia dell'appetito che del peso corporeo (Meeran et al., 1999). Comunque, l'inibizione dell'assunzione di cibo indotta dal GLP-1 è solamente transitoria (Donahey et al., 1998). Infatti la distruzione del GLP-1R non sembra modificare il comportamento alimentare né di roditori transgenici né di soggetti geneticamente obesi (Scrocchi et al., 1996; 2000). Quindi, nel caso di roditori "knockout" il GLP-1 non è essenziale né per la regolazione dell'appetito né per il controllo a lungo termine del peso corporeo.



Effetti biologici del GLP-1 in differenti organi e tessuti.
Da Meier et al., 2002

4.2.2. Grelina

4.2.2.1. GENERALITÀ

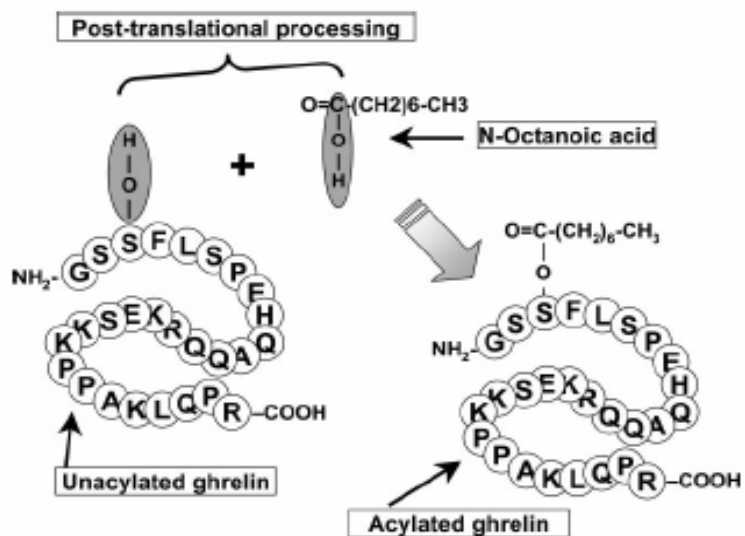
I “Growth-hormone secretagogues” (GHSs) sono piccole molecole sintetiche di natura proteica e non, in grado di stimolare, sia in vivo che in vitro, il rilascio dell’ormone della crescita (GH) dalla ghiandola pituitaria anteriore mediante il legame con uno specifico recettore appartenente alla famiglia dei “G-protein-coupled receptor”, il GHS-R (Bowers C.Y., 1998). Recentemente, un nuovo ligando endogeno del GHS-R è stato isolato e caratterizzato dallo stomaco dei Mammiferi (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000). A tale ligando è stato dato il nome “ghrelin”, da “*ghre*”, radice proto-indo-europea della parola “growth” e “*relin*”, poiché mostra attività rilasciante il GH (Kojima et al., 1999).

4.2.2.2. STRUTTURA E SINTESI

La grelina è un piccolo peptide di sintesi di 28 aminoacidi caratterizzato da una modificazione acilica al terzo residuo di serina (Ser³) della catena N-terminale, essenziale per la sua attività biologica (Kojima et al., 1999). Isolata e caratterizzata per la prima volta nello stomaco di ratto (Kojima et al., 1999), e successivamente in quello di uomo (Date et al., 2000), la grelina mostra in entrambi la stessa struttura ad eccezione di due aminoacidi in posizione 11 e 12. E’ codificata in un prepro-ormone, denominato prepro-ghrelin, in cui è

possibile distinguere una regione segnale, una regione matura ed una regione C-terminale; a seguito, poi, di modificazioni e processi post-traslazionali, diventa peptide attivo. La modificazione acilica più frequente è quella da acido n-octanoico ($\text{O}=\text{CO}-[\text{CH}_2]_6-\text{CH}_3$), ma è possibile rinvenire anche modificazioni da acido decanoico ($\text{O}-\text{CO}-\text{C}_9\text{H}_{19}$). I recenti progressi nel campo della biologia molecolare hanno reso possibile la purificazione e l'identificazione di un altro peptide attivo in grado di legare il GHS-R, il des-Gln¹⁴-Ghrelin (Hosoda et al., 2000). Questo peptide, derivante da uno "splicing" alternativo del gene codificante per la grelina, è strutturalmente identico al peptide gastrico, ad eccezione di un residuo di glutamina in posizione 14. Consta, infatti, di 27 aminoacidi ma conserva la modificazione lipidica, tanto è che sembra possedere le stesse attività ormonali della grelina (Hosoda et al., 2000). Oltre alle forme acilate è stata individuata anche una forma non-acilata di grelina, che rappresenterebbe circa l'80-90% dell'ormone circolante (Kojima et al., 2001). Questa forma predominante di grelina sierica sarebbe priva di qualsiasi effetto sull'asse endocrino e sull'omeostasi energetica, data la sua incapacità a legare ed attivare il GHS-R, ma non sarebbe biologicamente inattiva. Infatti, la grelina non-acilata prenderebbe parte, con la forma acilata, ad alcune azioni cardiovascolari e alla modulazione della proliferazione cellulare (Cassoni et al., 2001; Kojima et al., 2001). Tali effetti sono, probabilmente, da ricondursi

all'esistenza, nel sistema cardiovascolare e nel pancreas, di sottotipi di GHS-R che riconoscono e legano la grelina indipendentemente dalla presenza della modificazione lipidica, fondamentale invece per l'attività GH rilasciante (Cassoni et al., 2001; Baldanzi et al., 2002; Muccioli et al., 2002).



Formazione di grelina acilata e non.
Da van der Lely et al., 2005

Sebbene sia espressa nel nucleo arcuato dell'ipotalamo (Lu et al., 2002), nella ghiandola pituitaria (Korbonits et al., 2001) ed in diversi tessuti periferici, quali il rene, la placenta, il pancreas ed il surrene (Mori et al., 2000; Gualillo et al., 2001; Volante et al., 2002; Andreis et al., 2003), il principale sito di produzione della grelina è lo stomaco (Kojima et al., 1999; Ariyasu et al., 2001). Studi

immunoistochimici e tecniche di ibridazione in situ hanno identificato le cellule sintetizzanti grelina in un distinto tipo cellulare endocrino, denominato “X/A-like cells”, localizzato nell’epitelio della mucosa del corpo e del fondo (Date et al., 2000; Dornonville de la Cour et al., 2001; Sakata et al., 2002). Proprio in tal sede sembrerebbe implicata nella regolazione della motilità gastrica e della secrezione acida (Masuda et al., 2000; Date et al., 2001).

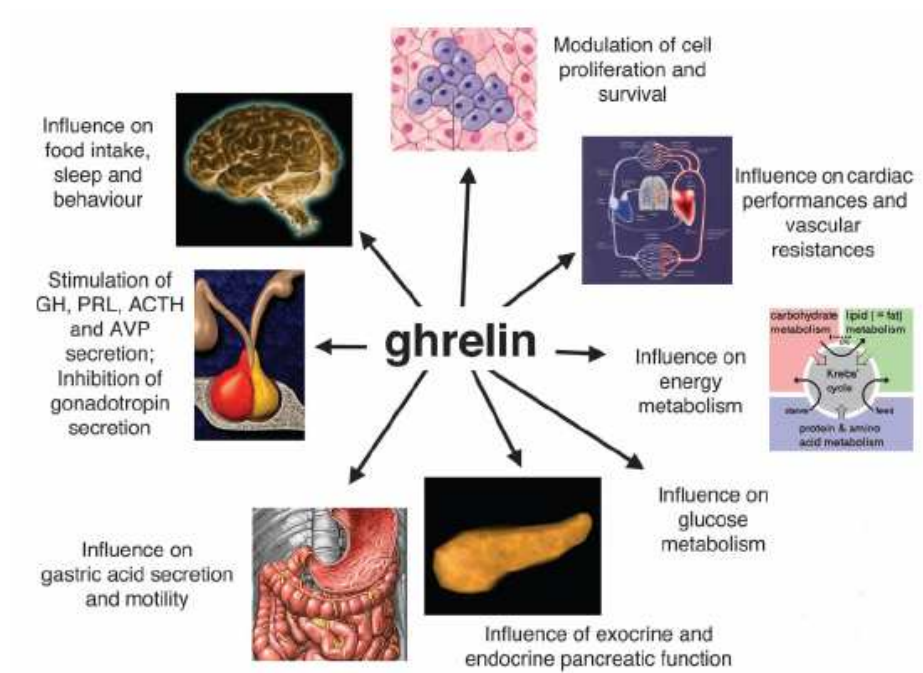
La biosintesi e la secrezione di grelina da parte dello stomaco sono influenzate dal comportamento alimentare. Infatti, le concentrazioni plasmatiche di grelina aumentano durante il digiuno e decrescono nella fase post-prandiale (Cummings et al., 2001; Tschöp et al., 2001). Questo suggerisce che tale peptide, dal sito di produzione, attraverso il circolo sistemico, veicoli al SNC segnali di fame fungendo da potente stimolatore dell’appetito. Non sono stati ancora identificati tutti i fattori che partecipano a questa regolazione, ma sicuramente un ruolo chiave spetta al tasso ematico di glucosio (Tschöp et al., 2000). Infatti, è stato verificato che nei roditori la somministrazione per via orale o intravenosa di glucosio determina una riduzione della quantità di grelina circolante (Tschop et al., 2000).

4.2.2.3. EFFETTI BIOLOGICI

L'azione principale della grelina è quella di stimolare, sia in vivo che in vitro, il rilascio dell'ormone della crescita (GH) dalla ghiandola pituitaria anteriore mediante il legame con il GHS-R, principalmente localizzato nell'ipofisi e nell'ipotalamo dove risiedono, come è stato detto in precedenza, i principali centri regolatori dell'appetito (Bowers C.Y., 1998). Inducendo la secrezione di GH, la grelina partecipa attivamente alla regolazione dell'assunzione di cibo, del metabolismo energetico e del peso corporeo (Wren et al., 2000; Kamegai et al., 2001; Nakazato et al., 2001). E' risaputo, infatti, che il GH svolge importanti funzioni metaboliche, tra cui quelle proteolitiche e lipolitiche: quindi, un soggetto adulto con un deficit dell'ormone della crescita presenterà una ridotta massa muscolare e una tendenza all'accumulo di depositi adiposi con conseguente obesità.

Studi inerenti la distribuzione del GHS-R hanno evidenziato la diffusione di questo recettore non solo nel SNC, ma anche in molteplici tessuti periferici (Guan et al., 1997). Infatti, oltre all'attività GH rilasciante, la grelina influenza l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi stimolando il rilascio della prolattina (PRL) e dell'ACTH (Arvat et al., 1997) ed inibendo la secrezione di gonadotropine. Modula la secrezione acida e la motilità gastrointestinale (Masuda et al., 2000), nonché le funzioni pancreatiche esocrine ed endocrine (Zhang et al., 2001; Date et al., 2002). Infine, influenza le performance cardiache e

le resistenze vascolari (Bodart et al., 2002; Okumura et al., 2002) ed inibisce la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule neoplastiche (Cassoni et al., 2001).



Principali effetti biologici della grelina
Da van der Lely et al., 2005

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5.

SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni è andato accrescendosi l'interesse per la comprensione degli intimi meccanismi che presiedono al controllo dell'assunzione di cibo ed al mantenimento dell'omeostasi energetica nei Mammiferi, ed è stato così messo in risalto il complesso sistema di interazioni che si realizza tra il SNC e la periferia (tessuto adiposo e tratto gastroenterico). In particolare, l'intero tratto gastrointestinale influenzerebbe la frequenza e le dimensioni dei singoli pasti, essendo la fonte di circa una dozzina di segnali ormonali e paracrini, rilasciati in seguito al transito di cibo e responsabili, nella quasi totalità dei casi, dell'insorgenza della caratteristica sazietà post-prandiale. Infatti, tali molecole attraverso le afferenze vagali o gli umori circolanti inviano ai centri superiori di controllo informazioni inerenti la quantità e la qualità degli alimenti presenti nel distretto digestivo, che inevitabilmente si riflettono in un cambiamento del comportamento alimentare, con l'interruzione dell'assunzione di cibo.

Le numerose ricerche condotte per lo più su animali da laboratorio, e rivolte principalmente alla caratterizzazione ed allo studio degli effetti biologici dei molteplici peptidi ipotalamici sul controllo dell'appetito, hanno portato alla individuazione, sia nel SNC che nel tratto gastroenterico, di nuove sostanze coinvolte nel

mantenimento dell'omeostasi energetica e di un peso corporeo stabile. La grelina, la leptina, l'orexina-A, e l'orexina-B sono i peptidi che negli ultimi anni hanno suscitato il maggiore interesse, sebbene le attuali conoscenze siano il risultato di studi approfonditi eseguiti per la maggior parte sui Mammiferi. Di recente, però, proprio in virtù dei loro effetti sul comportamento alimentare e sul bilancio energetico, tali peptidi hanno risvegliato un considerevole interesse anche fra le diverse classi di Vertebrati non-mammiferi. Fino ad oggi la grelina e le orexine sono state sequenziate e caratterizzate negli Uccelli (Kaiya et al., 2002; Ohkubo et al., 2002), negli Anfibi (Kaiya et al., 2001; Alvarez and Sutcliffe, 2002) ed in alcuni Pesci (Alvarez and Sutcliffe, 2002; Kaiya et al., 2003a; 2003b; 2003c), mentre la leptina è stata isolata solo in alcune specie di Uccelli (Doyon et al., 2001) e di Pesci (Johnson et al., 2000). In alcuni lavori precedenti, immunoreattività alla grelina è stata osservata esclusivamente in alcune aree ipotalamiche e nel proventriglio di pollo, nonché nello stomaco di trota (Ahmed e Harvey, 2002; Wada et al., 2003; Sakata et al., 2004); la presenza di cellule immunoreattive alle orexine è stata indagata soltanto nel SNC di rana (Galas et al., 2001); l'immunoreattività alla leptina è stata investigata soltanto nello stomaco di rana, trota e lucertola (Muruzabal et al., 2002).

Considerando che nei Mammiferi, la grelina e le orexine sono espresse anche nei vari segmenti dell'intestino e, data la mancanza di

dati bibliografici inerenti la presenza di leptina e GLP-1 nell'intestino di Vertebrati non-mammiferi, è sembrato interessante studiare, mediante tecniche di immunostochimica, la localizzazione ed il pattern di distribuzione di cellule secernenti tali peptidi nell'intero tratto gastroenterico di esemplari di pollo domestico (*Gallus domesticus*) e di due specie di Pesci Teleostei (*Dicentrarchus labrax* e *Carassius auratus*).

CAPITOLO 6.

ANATOMIA DELL'APPARATO DIGERENTE DEI PESCI

L'apparato digerente dei Pesci è topograficamente suddiviso in quattro regioni (Harder W., 1975):

- intestino craniale (o cefalico);
- intestino anteriore;
- intestino medio;
- intestino posteriore.

6.1. INTESTINO CRANIALE

L'intestino craniale comprende tutti gli organi localizzati nella regione del cranio viscerale ed è distinguibile nelle porzioni orale e branchiale. La cavità orale contiene la lingua e i denti. La prima, generalmente, nei pesci è scarsamente sviluppata. Essa, infatti, essendo priva di muscolatura, costituisce una semplice protuberanza del pavimento boccale frapposta fra le file dentali. I denti, nei pesci predatori o carnivori possono rinvenirsi nella parte alta (denti vomerini) e laterale (denti palatini) della cavità orale e sulle mascelle (denti premascellari e mascellari), mentre i pesci erbivori e detritivori

posseggono denti anche nel cavo faringeo, derivanti da formazioni delle arcate branchiali. Il limite fra le cavità orale e branchiale non è ben definito. Gli archi branchiali si estendono ventralmente fino all'angolo dell'arco ioide, localizzato generalmente in corrispondenza dell'angolo della mascella inferiore. Solitamente fra il IV ed il V arco branchiale, in alcune famiglie di teleostei, sono alloggiati gli organi epibranchiali, denominati anche diverticoli faringei. Si tratta di due sacchi a fondo cieco di forma tondeggianti od elicoidale dove si andrebbero ulteriormente a concentrare le particelle di cibo prima di essere trasferite all'esofago (Harder W., 1975).

6.2. INTESTINO ANTERIORE

L'intestino anteriore comprende l'esofago e lo stomaco. E' limitato anteriormente dall'apertura delle branchie e posteriormente dal piloro. Nei pesci privi di stomaco, come i Ciprinidi, il limite posteriore della regione è dato dall'apertura del dotto biliare nell'intestino. L'esofago è un tubo ampio, breve e rettilineo. Microscopicamente presenta la consueta struttura dei visceri cavi, con il susseguirsi dall'interno verso l'esterno delle tuniche mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa. La mucosa dell'esofago è sollevata in pieghe longitudinali ed è rivestita da un epitelio squamoso pluristratificato nella porzione anteriore e da un epitelio cilindrico

semplice nella porzione posteriore. E' costituito principalmente da cellule mucose secernenti sostanze muco-simili che conferiscono alla parete del viscere un aspetto viscido. Al di sotto dell'epitelio si rinviene uno strato di tessuto connettivo lasso, la lamina propria, particolarmente ricco in vasi linfatici, sanguigni e fibre elastiche. La muscolaris mucosae è assente, mentre la sottomucosa è rappresentata da tessuto connettivo piuttosto denso rispetto a quello della lamina propria. La tunica muscolare consta di muscolatura striata nella porzione anteriore dell'esofago e di muscolatura liscia nelle porzioni media e posteriore ed è distinta in due strati: uno interno, sottile con fibre ad andamento longitudinale, ed uno esterno, più spesso con fibre ad andamento circolare. Tale situazione è in singolare contrasto con le altre regioni del tratto digerente dove questi strati ricorrono in senso inverso. Infatti, procedendo caudalmente verso lo stomaco (o in prossimità dell'intestino medio nelle specie che non lo presentano) la successione degli strati muscolari si ribalta. Lo strato interno longitudinale gradualmente diviene più sottile per poi sparire completamente e compare un nuovo strato di muscolatura longitudinale, esterno a quello circolare e composto da fibrocellule muscolari lisce. Al contrario la muscolatura circolare persiste, ma anche qui le fibre striate sono rimpiazzate da fibre lisce, potendo così individuare con esattezza la zona di transizione tra la muscolatura dell'esofago e quella dello stomaco. La tunica sierosa, infine,

corrisponde all'epitelio del peritoneo che riveste le pareti della cavità addominale (Hibiya T., 1982).

Lo stomaco, nei Pesci in cui esso è presente, rappresenta la porzione caudale dell'intestino anteriore. Da un punto di vista morfologico, lo stomaco può presentarsi: 1. di forma rettilinea, come nel luccio; 2. a forma di U con una branca discendente (regione cardiaca) ed una branca ascendente (regione pilorica), tipico della maggior parte dei Teleostei e degli Elasmobranchi; 3. a forma di una Y per la presenza di un sacco cieco in aggiunta alle regioni cardiaca e pilorica, caratteristico di alcuni Selaci e Teleostei (Harder W., 1975).

Microscopicamente è possibile distinguere le tuniche mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa. La mucosa è sollevata in pieghe piuttosto basse in corrispondenza della regione cardiaca, ma destinate ad approfondirsi verso il sacco cieco e la regione pilorica. È rivestita da un epitelio cilindrico semplice, con cellule di forma pressoché cuboidale nella regione cardiaca e cellule colonnari alte nelle restanti porzioni dello stomaco. Il nucleo è generalmente posizionato nella regione basale della cellula ed il citoplasma apicale contiene sostanze muco-simili. La sottostante lamina propria, costituita da uno strato di tessuto connettivo lasso molto ben sviluppato, contiene, oltre a numerosi vasi sanguigni e linfatici, anche le ghiandole gastriche. L'epitelio di rivestimento di tali ghiandole è composto di cellule cubiche contenenti numerosi piccoli granuli acidofili. A differenza di

quanto riscontrato nei Mammiferi e negli Uccelli, nei Pesci non è possibile distinguere cellule principali e cellule parietali, in quanto tutte le cellule ghiandolari sono dello stesso tipo. La muscolaris mucosae è assente, mentre la sottomucosa è rappresentata da un sottile strato di tessuto connettivo lasso. La tunica muscolare è composta di due strati: uno più interno e spesso di muscolatura circolare ed un altro relativamente più sottile ed esterno di muscolatura longitudinale. La sierosa corrisponde all'epitelio peritoneale(Hibiya T., 1982).

Il piloro è la porzione terminale dello stomaco. Non è altro che un ripiegamento a forma di anello della mucosa intestinale all'uscita dello stomaco. Talvolta può contenere anche fasci di fibre muscolari lisce e allora diventa un vero e proprio sfintere suscettibile di apertura e chiusura ed in grado perciò di regolare il passaggio del chimo dallo stomaco all'intestino medio (Harder W., 1975).

Nelle specie prive di stomaco (ad esempio Ciprinidi e Blennidi) la porzione anteriore dell'intestino si dilata in vario modo, dando luogo al bulbo intestinale, che può essere considerato un analogo dello stomaco almeno da un punto di vista morfologico. La mucosa presenta delle profonde pieghe e le cellule epiteliali di rivestimento sono alte e colonnari, sebbene prive di sostanze muco-simili ed acidofile. Inoltre, sia la lamina propria che la muscolaris mucosae sono chiaramente distinguibili. La sottomucosa è composta da

tessuto connettivo lasso che solo nella regione adiacente alla muscolaris mucosae diviene piuttosto denso (Harder W., 1975).

6.3. INTESTINO MEDIO

L'intestino medio è abitualmente considerato "l'intestino propriamente detto" sia in virtù della sua derivazione embriologica che del suo ruolo funzionale. Infatti, in riferimento alla sua evoluzione, è la sola porzione del tratto digestivo ad essere rivestita da un epitelio di origine endodermica, mentre, da un punto di vista fisiologico, l'intestino medio è il sito in cui si completa la digestione chimica dell'alimento e si realizza l'assorbimento dei principi nutritivi. La suddivisione dell'intestino in duodeno, digiuno ed ileo praticata per i Mammiferi non può essere applicata ai Pesci. In questa classe, soprattutto negli esemplari carnivori ed onnivori, infatti, l'intestino è molto spesso un tubo allungato e diritto che si estende per l'intera lunghezza della cavità addominale. Quando invece è disposto a formare delle anse, come nelle specie litofaghe per favorire l'assimilazione di sostanze vegetali, la disposizione di queste differisce in modo considerevole rispetto alla situazione riportata Mammiferi (Harder W., 1975).

Microscopicamente nell'intestino medio è possibile distinguere, procedendo dall'interno verso l'esterno, quattro tuniche: mucosa,

sottomucosa, muscolare e sierosa. La tunica mucosa è sollevata in pieghe non molto rilevate. Queste possono essere longitudinali o trasversali, rettilinee o a zig-zag. In alcuni casi possono assumere l'aspetto di cripte oppure di papille, tali da conferire villosità alla parete intestinale. La mucosa è a sua volta costituita da un epitelio di tipo cilindrico semplice, particolarmente ricco in cellule mucipare, e da una lamina propria costituita da tessuto connettivo lasso reticolare, ricco di vasi sanguigni e linfatici, che va a formare un sottile strato in corrispondenza delle pieghe della membrana mucosa per poi continuarsi con la tunica sottomucosa. Quest'ultima è abbastanza sottile e consta di fasci di tessuto connettivo fibroso disposti longitudinalmente e circolarmente. In molte specie uno strato di tessuto connettivo denso, denominato strato compatto o membrana compatta, separa la lamina propria dalla tunica sottomucosa. La tunica muscolare, costituita da due strati, uno interno circolare ed uno esterno longitudinale, continua senza subire modificazioni quella dell'intestino anteriore. Esternamente l'intestino medio è rivestito dall'epitelio peritoneale (Hibiya T., 1982).

Caratteristiche formazioni dell'intestino medio dei Pesci Teleostei sono i ciechi pilorici o appendici piloriche. Si tratta di evaginazioni digitiformi a fondo cieco della parete intestinale localizzate in prossimità della regione pilorica, in grado di aumentare la superficie digerente. Il loro numero è estremamente variabile (da 1

a 1000) a seconda delle specie considerata. Le appendici piloriche presentano una struttura molto simile a quella dell'intestino vero e proprio. Infatti, non contengono cellule o tubuli ghiandolari, né alcuno speciale meccanismo di chiusura o sfintere (Harder W., 1975).

6.4. INTESTINO POSTERIORE

L'intestino posteriore (o retto) rappresenta la porzione terminale del tratto digestivo, non facilmente distinguibile e talvolta caratterizzato dalla presenza di una valvola ileo-rettale posta tra l'intestino posteriore ed il retto. L'intestino posteriore si distingue dalle altre porzioni intestinali per il diametro più piccolo e la consistenza più soda, dovuta ad una muscolare circolare accresciuta. La mucosa è sollevata in pliche longitudinali poco profonde ed è rivestita da un epitelio di tipo semplice e prismatico contenente cellule mucose. La muscolaris mucosae e lo strato compatto mancano, mentre la tunica muscolare è rappresentata da uno spesso strato che va incontro ad un graduale assottigliamento procedendo verso l'ano (Hibiya T., 1982).

APPARATO DIGERENTE DEI PESCI TELEOSTEI

Intestino Craniale



Intestino Anteriore-Esofago



Intestino Anteriore-Stomaco



Ciechi pilorici



Intestino Medio



Intestino Posteriore



CAPITOLO 7.

ANATOMIA DEL TRATTO GASTROENTERICO

DEGLI UCCELLI

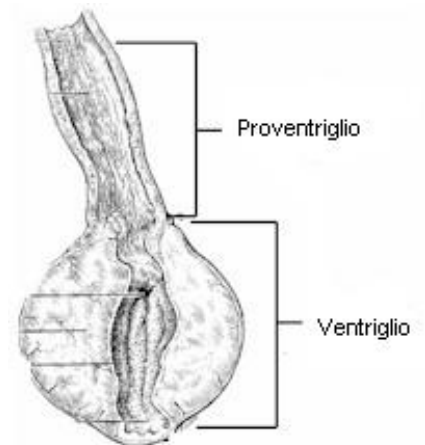
L'apparato digerente degli Uccelli è topograficamente suddiviso in intestino cefalico, formato dalla cavità buccale e dal cavo faringeo, ed intestino del tronco, comprendente le seguenti porzioni (Nickel et al., 1984):

- Intestino anteriore, con l'esofago e lo stomaco;
- Intestino medio o intestino tenue, con duodeno, digiuno ed ileo;
- Intestino terminale o intestino crasso, con il cieco, che è duplice negli Uccelli, il colon molto corto e la cloaca che esplica molteplici funzioni.

7.1. STOMACO

Negli Uccelli domestici lo stomaco è costituito da due parti anatomicamente e funzionalmente ben distinte: lo stomaco ghiandolare e lo stomaco muscolare.

Proventriglio e Ventriglio
negli Uccelli domestici



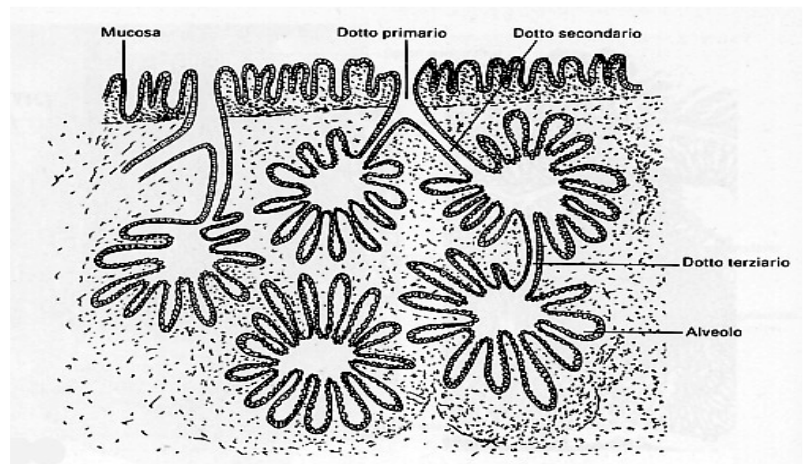
7.1.1. Stomaco ghiandolare

Lo stomaco ghiandolare, o proventriglio, è un piccolo viscere cavo posto tra l'esofago, che continua senza una precisa delimitazione, e lo stomaco muscolare da cui è nettamente separato da un restringimento denominato istmo. E' situato nel settore inferiore sinistro della cavità del corpo, con l'asse longitudinale diretto in senso cranio-caudale, dorsoventrale e medio-laterale. E' alloggiato in una nicchia del sacco peritoneale viscerale, superiormente al fegato, sulla cui superficie dorsale determina una propria impronta, ed in prossimità del sacco aerifero addominale sinistro e del sacco aerifero caudale sinistro del torace. Il proventriglio ha una forma fusata (nel pollo adulto raggiunge, infatti, una lunghezza di 4-5 cm ed un diametro di 2 cm), con un lume ristretto e pareti spongiose molto spesse per l'enorme sviluppo delle strutture ghiandolari (Nickel et al., 1984). Microscopicamente presenta la consueta struttura dei visceri cavi, con il susseguirsi, procedendo

dall'interno verso l'esterno, delle tuniche mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa. La mucosa è sollevata in pieghe di altezza variabile che raggiungono in media i 500 μm nel pollo adulto. Tali pieghe sono state denominate "pliche" e le depressioni intercorrenti "solchi". Essa è rivestita da un epitelio cilindrico monostratificato, le cui cellule tendono a ridursi in altezza in direzione della base dei solchi fino all'interno della regione basale dove si presentano di forma pressoché cuboidale, particolarmente ricco in cellule mucipare ed in ghiandole, distinte in tubulari semplici e tubulari composte. Le ghiandole tubulari semplici sono più superficiali: infatti si prolungano al massimo entro la sottostante lamina propria. Le ghiandole tubulari composte, invece, si approfondano sia nella muscolaris mucosae, separandola in uno strato interno ed in uno strato esterno, sia nella sottomucosa. Le ghiandole proventricolari sono organizzate in numerosi lobuli, rotondi o polimorfi, per la presenza di setti di tessuto connettivo composti da fibre collagene ed elastiche e contenenti vasi sanguigni e nervi. Ciascun adenomero è costituito da numerosi alveoli secernenti che confluiscono in tubuli collettori terziari; questi, a loro volta, fanno capo a condotti secondari che si fondono tra loro per formare pochi dotti primari che passano attraverso le papille disseminate sulla mucosa e si aprono nel lume. I dotti primari, secondari e terziari sono tutti rivestiti da un epitelio cilindrico simile a quello della superficie mucosa per la presenza di

cellule mucipare che tendono a ridursi procedendo all'interno delle ghiandole. Nella regione del collo degli adenomeri, dove l'epitelio cilindrico dei dotti terziari si fonde con l'epitelio ghiandolare è possibile individuare un epitelio con caratteristiche intermedie tra i precedenti.

Rappresentazione schematica delle ghiandole tubulari composte del proventriglio di pollo



L'epitelio ghiandolare consta di un monostrato di cellule cuboidali o colonnari basse (a seconda del grado di attività funzionale), la cui altezza varia da 8 a 10 μm in un soggetto adulto. Si tratta di cellule ossintopeptiche, in grado cioè di sintetizzare e secernere sia acido cloridrico che pepsinogeno, enzima precursore della pepsina, combinando così le funzioni delle cellule parietali (od ossintiche od acidofile) e delle cellule principali (o peptiche o zimogeniche) dei Mammiferi. Il nucleo delle cellule ghiandolari, per lo più sferico od ovoidale, contiene materiale nucleare uniformemente

granulare e piccoli raggruppamenti di cromatina. La sua posizione all'interno della cellula varia da centrale a basale a seconda dello stato funzionale della cellula. Infatti, dopo un digiuno di circa 24 ore le cellule si presentano di forma cuboidale, con un nucleo basale e con numerosi granuli di pepsinogeno; dopo il pasto, la cellula si allunga e si assottiglia ed il nucleo si porta in posizione centrale, essendosi notevolmente ridotto il numero di granuli liberati durante il processo digestivo. I granuli secretori vengono poi gradualmente ricostituiti, fino a che, dopo un periodo di diverse ore, la cellula riacquista la sua forma e contenuto iniziali.

La tunica sottomucosa, composta da tessuto connettivo fibroso, è ridotta ad un sottile strato a causa del diffuso propagarsi della muscolaris mucosae. La muscolare è ben rappresentata: è possibile distinguere uno strato interno, più spesso, costituito da fibre muscolari ad andamento circolare, ed uno strato esterno, molto più sottile di fibre muscolari lisce ad andamento longitudinale. Tra i due strati viene a trovarsi il plesso nervoso mienterico. Esternamente c'è un sottile strato di tessuto connettivo lasso avventiziale ed il rivestimento peritoneale (Hodges R.D., 1974).

Nello stomaco ghiandolare, grazie alla presenza di un ambiente decisamente acido dovuto all'acido cloridrico e alla secrezione di pepsinogeno e mucina da parte delle ghiandole tubulari proventricolari, ha inizio la digestione chimica delle macromolecole

proteiche costituenti la dieta, destinata poi a completarsi nello stomaco muscolare.

In corrispondenza dell'istmo, zona intermedia tra proventricolo e ventricolo, si assiste ad un graduale cambiamento di struttura: le pliche diventano più basse, i solchi meno profondi e le ghiandole da tipicamente proventricolari iniziano a trasformarsi in ghiandole ventricolari. La tunica muscolare dell'istmo consta di uno spesso strato, più esterno, di muscolatura longitudinale, di uno spesso strato medio di muscolatura circolare e, separato da una quasi inesistente sottomucosa, di uno strato di muscolaris mucosae con fibre ad andamento longitudinale dello spessore di circa la metà dello strato circolare. Nel punto in cui l'istmo si fonde con il proventricolo, lo strato longitudinale esterno della muscolare diventa più sottile od eventualmente scompare, e la muscolaris mucosae si fonde con lo strato circolare per costituire l'ammasso principale della muscolatura ventricolare (Hodges R.D., 1974).

7.1.2. Stomaco muscolare

Lo stomaco muscolare, o ventriglio, è un voluminoso viscere di consistenza dura e di colore rosso. Occupa quasi completamente non solo la porzione caudale del settore inferiore sinistro della cavità celomatica ed oltrepassa verso destra la linea mediana. E' in rapporto con la faccia dorsale del lobo sinistro del fegato ed, in parte, anche

con il lobo destro; a destra viene a contatto, cranialmente con la milza, caudalmente con varie parti dell'intestino, e raggiunge con il suo contorno ventrale anche la parete ventrale dell'addome. Nella femmina, nel periodo di ovodeposizione, assume rapporti con l'ovaio e con le anse dell'ovidotto. Infine il sacco aerifero addominale sinistro si adagia sulla superficie laterale destra dello stomaco muscolare e può anche spingersi oltre il margine dorsale, sulla faccia laterale sinistra del ventriglio, a meno che quest'ultima non prenda aderenza, mediante tessuto connettivo, con la parete addominale. La forma e la composizione del ventriglio variano a seconda della specie e del tipo di dieta. Negli Uccelli ad alimentazione prevalentemente vegetale (insettivori, erbivori e granivori) lo stomaco muscolare si presenta a forma di lente biconvessa con una muscolatura molto ben sviluppata. Invece, negli Uccelli per lo più carnivori che si nutrono quindi di cibo abbastanza morbido, il ventriglio è un sacco a pareti più sottili, a volte difficilmente distinguibile a colpo d'occhio dallo stomaco muscolare. In particolare, nel ventriglio dei gallinacci, quindi uccelli granivori, si possono distinguere un corpo, a pareti spesse, costituito da una parte dorsale ed una parte ventrale, e due sacchi ciechi, uno craniale ed uno caudale, a pareti sottili. Le due parti del corpo del ventriglio sono costituite da uno strato molto spesso di muscolatura liscia, di colore rosso cupo tendente al violaceo. Le fibre di questo complesso muscolare, denominato muscoli laterali, originano dai

cosiddetti centri tendinei, di natura connettivale e lucentezza madreperlacea, situati sulle superfici laterali e circondano i contorni dorsale e ventrale del corpo dello stomaco. La tonaca interna dello stomaco muscolare è separata da quella dello stomaco ghiandolare, in particolar modo nel pollo, da un anello di mucosa che prende il nome di zona intermedia. In questa zona è possibile rinvenire del tessuto linforeticolare e solo poche cripte con epitelio secernente (Nickel et al., 1984).

La superficie interna del ventriglio è delimitata da una mucosa con epitelio cilindrico semplice, la quale presenta rilievi in forma di creste, disposte in fila. Nella sottostante lamina propria sono contenute le ghiandole tubulari; queste variano da specie a specie, possono presentarsi isolate o in gruppi e sboccano in superficie. Vengono considerate omologhe alle ghiandole piloriche dei Mammiferi, nonostante assolvano ad una funzione completamente diversa. Il loro secreto, emesso in continuazione, indurisce in superficie formando sopra l'epitelio della mucosa una patina spessa e dura, di natura glicoproteica, indicata come strato di coilina (o strato cheratinoide). Detto strato, nella regione del centro tendineo è liscio, mentre presenta delle creste longitudinali nella restante parte del corpo dello stomaco e creste trasversali in corrispondenza dei sacchi ciechi (Hodges R.D., 1974).

Nel ventriglio non solo si completa la digestione delle proteine, iniziata nel proventriglio, ma, si realizza principalmente la digestione fisica del cibo: infatti, le lamine raschianti e la considerevole muscolatura hanno il compito di tritare e sminuzzare a fondo sia il materiale alimentare, rendendolo così disponibile all'azione degli enzimi digestivi intestinali, che i grani duri. Questa azione dello stomaco masticatore è efficacemente potenziata dai sassolini che vengono normalmente introdotti dagli Uccelli granivori.

Non lontano dal punto di passaggio dello stomaco ghiandolare nello stomaco muscolare, sul lato destro, si trova l'antrum pilorico, una piccola dilatazione che mette in comunicazione il ventriglio con il duodeno. L'antrum pilorico è strutturalmente molto simile allo stomaco muscolare per quanto riguarda l'organizzazione della mucosa, mentre per gli strati di origine mesenchimale si osserva un'organizzazione più vicina al duodeno (Hodges R.D., 1974).

7.2. INTESTINO

Nel canale intestinale degli Uccelli, come in quello dei Mammiferi, si distinguono due parti principali: l'intestino tenue e l'intestino crasso. Anche negli Uccelli, inoltre, caratteristiche morfologiche permettono di suddividere l'intestino tenue in tre parti tipiche: duodeno, digiuno ed ileo. Diversa, invece, è la conformazione dell'intestino crasso. Al riguardo si deve segnalare l'esistenza di due intestini ciechi, uno dei quali, molto corto e non suddiviso, si continua nel colon. Forma e funzione delle diverse parti dell'intestino variano a seconda della specie. Ciò è dovuto a differenze individuali, di razza e di età, e al tipo di alimentazione, infatti nei gallinacei la lunghezza complessiva dell'intestino varia da 165 a 230 cm (Nickel et al., 1984).

7.2.1 *Intestino tenue*

Il duodeno inizia dal piloro dello stomaco muscolare e forma, in tutti gli Uccelli domestici, una lunga ansa ad U molto caratteristica, con un tratto discendente ed uno ascendente a decorso rettilineo e parallelo uniti da una striscia di mesentere, il legamento pancreaticoduodenale che va esaurendosi nel pancreas. La branca discendente è addossata inizialmente alla superficie laterale destra dello stomaco muscolare ed alla superficie dorsale del lobo destro del fegato, segue poi, adagiata sulle anse del digiuno, la parete addominale ventrale in

direzione caudale che si incurva a sinistra lungo il contorno caudale dello stomaco muscolare e qui, descrivendo un arco acuto, si continua nella branca dorsale ascendente, situata a destra. Anche questa contrae rapporti con la superficie dorsale del fegato poi, in vicinanza del testicolo o dell'ovaio destro, si piega e, dopo aver descritto un arco intorno al rene craniale destro, si continua nel digiuno. Il duodeno è mantenuto in situ, oltre che dalla lamina sierosa tesa tra le due branche e derivante dal meso dorsale, da un legamento diretto allo stomaco muscolare e dal legamento epato-duodenale, che fissa la branca ascendente all'ilo del fegato e nel quale passano le vie biliari. In genere come limite tra duodeno e digiuno viene indicato quel punto del canale intestinale in cui la branca ascendente si piega ad arco, da sinistra a destra, caudalmente all'arteria mesenterica craniale.

Il digiuno, anche negli Uccelli, è il tratto di intestino che ha la maggiore lunghezza: nel pollo raggiunge approssimativamente i 105 cm. Data la sua lunghezza, il digiuno occupa la maggior parte della metà caudale destra della cavità del corpo. Ha rapporti di vicinanza con lo stomaco, la milza, il lobo destro del fegato e nella femmina, nel periodo di deposizione delle uova, anche con l'ovaio e con le anse dell'ovidotto. Appariscente è la disposizione, diversa da specie a specie, delle anse digiunali che vengono a formarsi in relazione all'accrescimento in lunghezza di questo segmento intestinale. In

particolare, nei Gallinacei ci sono 10-11 anse intestinali, grandi e piccole che sono fissate, in un arco di tre quarti di cerchio, al margine di un esteso meso-digiuno, lamina mesenteriale che contiene il tronco digiunale. Il limite tra digiuno ed ileo è indicato dall'attacco dei legamenti ileo-cecali, che uniscono i ciechi, per tutta la loro lunghezza, con l'ileo. Pertanto nel pollo la lunghezza dell'ileo corrisponde all'incirca alla lunghezza degli intestini ciechi.

L'ileo viene distinto dal digiuno in base alle caratteristiche morfologiche prima ricordate. Questo tratto del tubo intestinale, a decorso quasi rettilineo, inizia ventralmente alla cloaca, decorrendo sopra l'ansa duodenale e fiancheggiato sui due lati dagli intestini ciechi ai quali è unito dai legamenti ileocecali. All'altezza delle gonadi descrive un arco aperto caudalmente e rivolto dorsalmente a sinistra, quindi sbocca nell'intestino crasso (Nickel et al., 1984).

7.2.2 Intestino crasso

L'intestino crasso degli Uccelli, o colo-retto, è la porzione terminale dell'intestino, compresa tra la valvola ileo-cecale e la cloaca. Risulta costituito, come già detto, dal duplice cieco e dal colon: quest'ultimo è il tratto più breve di tutto l'intestino e, provvisto di uno sfintere cloacale ben sviluppato, sbocca nella prima parte dilatata ad ampolla della cloaca, cioè nel coprodeo.

I ciechi, lunghi circa 12-25 cm nel pollo, iniziano con un'apertura, resa stretta da una piega della mucosa, situata nel limite tra ileo e intestino terminale. Uniti all'ileo dai legamenti ileocecali già ricordati, nel pollo si dirigono, per un breve tratto, dapprima cranialmente, poi si incurvano in direzione caudale e raggiungono, con le loro estremità libere, la regione della cloaca. I loro rapporti con i visceri circostanti corrispondono a quelli già descritti per l'ileo. Negli intestini ciechi dei Gallinacei si possono distinguere tre porzioni, meglio evidenti quando detti visceri siano in stato di forte replezione: il cieco prossimale, il cieco medio ed il cieco distale. Il cieco prossimale, corto e stretto, è rivestito esternamente dal peritoneo e da una tunica avventiziale di connettivo lasso. Segue, una lamina muscolare alquanto sviluppata e composta di uno strato più esterno e sottile con fibre ad andamento longitudinale e di uno strato più interno e spesso di fibre ad andamento circolare, tra i quali è possibile individuare un plesso nervoso ben sviluppato. La sottomucosa è limitata ad un sottile strato eccetto dove ricorrono i vasi sanguigni ed i nervi. La muscolaris mucosae è poco sviluppata e consta solo di un piccolo fascio di fibre circolari. La membrana mucosa costituisce circa i 2/3 dello spessore totale della parete: i villi sono ben sviluppati sia in lunghezza che in larghezza, ma le cripte del Lieberkhun sono poco profonde. All'interno della tunica propria, sia alla base che dentro i villi è possibile rinvenire diversi aggregati

linfoidi. Il cieco medio si presenta di forma allungata, con un lume ampio e pareti sottili data la presenza di materiale fecale. Microscopicamente presenta grossomodo la stessa struttura del cieco prossimale, ad eccezione della tunica mucosa. Infatti, la muscolaris mucosae può essere distinta in uno strato interno circolare ed uno esterno con fibre ad andamento longitudinale od obliquo; i villi sono corti e smussati e la tunica propria sottostante contiene solo pochi noduli linfoidi. Il cieco distale, breve e a forma di vescicola allargata, possiede normalmente il diametro maggiore rispetto alle precedenti porzioni, anche se la struttura della muscolare, della sottomucosa e della muscolaris mucosae ricalca le descrizioni precedenti. I villi sono accorciati e smussati per l'incrementata distensione delle pareti ciecali. Piccoli aggregati linfoidi ricorrono sia nella tunica propria che nella sottomucosa: in questa seconda localizzazione essi tendono a deformare la muscolaris mucosae.

Il colon appare, anche in considerazione della sua ampiezza, come la diretta continuazione dell'ileo ed è fissato, nel suo decorso, ventralmente alla colonna vertebrale mediante un corto meso nel quale decorrono un ramo piuttosto grosso della vena porta, la vena coccigo-mesenterica e l'arteria mesenterica caudale; sbocca infine nel coprodeo.

La cloaca rappresenta la parte terminale dell'intestino e riceve, inoltre, le porzioni terminali dell'apparato genito-urinario. Partendo

dal colon e procedendo posteriormente, si distinguono tre camere, separate l'una dall'altra da pieghe anulari contrattili. La prima porzione, dilatata ad ampolla, è il coprodeo dove arrivano e si fermano temporaneamente le feci provenienti dall'intestino terminale. La seconda parte, meno ampia, viene chiamata urodeo. In questa porzione sboccano, in entrambi i sessi, gli ureteri; inoltre, nel maschio si aprono i due dotti deferenti, mentre nella femmina sbocca, mediante un orificio a fessura piuttosto ampio, l'ovidotto di sinistra. Nella terza porzione della cloaca, il proctodeo, negli Uccelli acquatici maschi si trova un organo paragonabile al pene dei Mammiferi; nel pollo in questa stessa sede esiste, invece, una piccola sporgenza della mucosa. Inoltre, nella parete dorsale del proctodeo si apre la borsa di Fabrizio, organo linforeticolare destinato a regredire fino a trasformarsi in un residuo fibroso atrofico, una volta raggiunta la maturità sessuale (Nickel et al., 1984).

Nella struttura generale dell'intestino si distinguono, procedendo dall'esterno verso l'interno, le tuniche sierosa, muscolare, sottomucosa e mucosa. La sierosa è costituita da un sottile strato di tessuto connettivo lasso, contenente alcune esigue fibre elastiche, nonché vasi sanguigni e nervi là dove esso si ispessisce per formare il mesentere. La tunica muscolare consta di uno strato interno circolare molto ben sviluppato e di uno strato esterno longitudinale decisamente poco evidente, separati da tessuto connettivo contenente

fibre elastiche, vasi sanguigni ed un plesso nervoso ben sviluppato corrispondente al plesso di Auerbach dei Mammiferi. La sottomucosa è così scarsamente sviluppata da essere quasi inesistente. Essa consta di uno strato molto sottile di tessuto connettivo che separa la muscolare esterna dalla muscolaris mucosae. La sua presenza risulta evidente solo dove i corpi cellulari del plesso nervoso sottomucoso (corrispondente al plesso di Meissner dei Mammiferi) aumentano in modo considerevole il loro spessore. La muscolaris mucosae non è ben sviluppata, essendo circa dello stesso spessore dello strato di muscolatura longitudinale esterna nel piccolo intestino, e addirittura meno spessa di questo nel grosso intestino e nei ciechi. Risulta costituita da fibre muscolari ad andamento longitudinale per tutta la lunghezza dell'intestino ad eccezione dei ciechi, dove è possibile distinguere due strati: uno più esterno, longitudinale ed uno più interno, circolare od obliquo. La tunica mucosa è sollevata in pliche longitudinali e fornita di prolungamenti digitiformi, i villi, che differiscono considerevolmente nel numero, nella forma e nella grandezza a seconda del segmento intestinale in cui si trovano. Tra i villi si aprono le cripte del Lieberkuhn, brevi e semplici dotti tubulari, ad andamento leggermente sinuoso, che occupano la maggior parte della tunica propria. Il resto della tunica propria, che va poi a formare il corion del villo, consta di tessuto connettivo lasso, contenente molte fibre reticolari, vasi sanguigni e linfatici, nervi e aggregati linfoidi.

L'epitelio di rivestimento della mucosa è di tipo cilindrico semplice, in cui è possibile individuare le cellule parietali (o principali), le cellule caliciformi mucipare, e le cellule enterocromaffini. Tali tipi cellulari sono prodotti alla base delle cripte per mitosi per migrare poi, gradualmente, verso le pareti delle cripte e dei villi ed essere, infine, riversate nel lume dall'apice dei villi. Perciò le forme mitotiche possono essere frequentemente rinvenute alla base delle cripte, per divenire rare o completamente assenti verso la sommità dei villi.

La cloaca è interamente rivestita da un epitelio cilindrico semplice molto simile a quello che tappezza il grosso intestino. Nel coprodeo forma dei villi bassi ed appiattiti alla base dei quali si aprono delle cripte del Lieberkhun molto brevi. All'interno dell'urodeo la mucosa si allarga in una serie di piccole pieghe irregolari, separate da solchi obliqui e longitudinali, ma non sembrano essere presenti villi veri e propri. A livello del proctodeo la natura dell'epitelio cambia abbastanza rapidamente: le grosse cellule caliciformi sono completamente perdute e l'epitelio diventa colonnare alto. In corrispondenza del dotto della Borsa di Fabrizio questo cambiamento dell'epitelio si associa ad un cambiamento anche nella struttura delle cripte: esse diventano ghiandole tubulari ramificate e vanno costituire la cresta linfoghiandolare di Jolly. Un ulteriore cambiamento dell'epitelio si rinviene in corrispondenza dello sfintere anale. Infatti, prima si trasforma in epitelio squamoso stratificato, poi, nel punto di

passaggio sui margini dell'orifizio diventa una cute tipicamente cornificata (Hodges R.D., 1974).

TRATTO GASTROENTERICO DEGLI UCCELLI

Ventriglio



Intestino Tenue



Ciechi pilorici



Colon



Cloaca



CAPITOLO 8.

MATERIALI E METODI

8.1. ANIMALI ED ALLESTIMENTO DEI CAMPIONI

Tra le specie aviarie, per la seguente ricerca sono stati utilizzati esemplari di *Gallus domesticus* di circa tre mesi di età e di entrambi i sessi, acquistati presso un allevamento locale. Il tratto gastroenterico, rapidamente prelevato dopo aver sacrificato gli animali previa anestesia con etere dietilico e successiva recisione della vena giugulare, è stato sezionato in piccoli campioni ottenuti dai seguenti segmenti: proventriglio, ventriglio, duodeno, digiuno, ileo, ciechi e colo-retto.

Oggetto della stessa ricerca sono stati anche Pesci Teleostei adulti, di ambo i sessi, di *Carassius auratus* e *Dicentrarchus labrax*, acquistati presso un allevamento locale. Queste due specie di Pesci differiscono per habitat, conformazione anatomica del tratto gastroenterico e comportamento alimentare. Infatti, il *Carassius auratus*, tipico teleosteo d'acqua dolce appartenente alla famiglia dei Ciprinidi, manca dello stomaco e presenta un segmento intestinale molto lungo e ripiegato; inoltre, da un punto di vista alimentare, è un pesce onnivoro, che si nutre di invertebrati di fondo, larve di insetti e,

scarsamente, di vegetali. Il *Dicentrarchus labrax*, teleosteo d'acqua salata appartenente alla famiglia dei Serranidi, presenta, invece, un comparto gastrico ben sviluppato, appendici piloriche ed un tratto intestinale particolarmente breve, ed inoltre è, da un punto di vista alimentare, un pesce tipicamente carnivoro che si ciba esclusivamente di piccoli invertebrati ed altri pesci.

Ciascun animale è stato anestetizzato in 0.1% di etile 3-aminobenzoato metansufonato (MS-222, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A) e sacrificato recidendo la spina dorsale alla base del cranio. Il tratto gastroenterico è stato, quindi, rapidamente prelevato e sezionato in campioni di piccole dimensioni. Negli esemplari di *Dicentrarchus labrax*, forniti, a differenza del *Carassius auratus*, di un vero e proprio stomaco, si è proceduto al sezionamento del comparto gastrico suddividendolo in porzione cardiaca, sacco cieco e porzione pilorica. In tutti gli animali, invece, il segmento intestinale è stato suddiviso in anteriore, medio e posteriore. Successivamente, campioni di uguale lunghezza ottenuti da ciascun segmento, sono stati sezionati lungo l'asse cranio-caudale e risciacquati in soluzione salina per allontanare il contenuto ivi presente.

I tessuti, lavati in soluzione salina per rimuovere il contenuto, sono stati immediatamente fissati in liquido di Bouin (15 ml di una soluzione acquosa satura di acido picrico; 5 ml di formalina al 10%; 1 ml di acido acetico glaciale) per 7-24 ore a temperatura ambiente,

disidratati in concentrazioni crescenti di etanolo (dall'etanolo a 70° fino all'etanolo assoluto per circa mezz'ora/un'ora, a seconda dello spessore dei campioni) e lasciati in metilbenzoato per le successive 24 ore. Dopo un passaggio in benzene e benzene-paraffina per complessive 2 ore, sono stati inclusi in paraffina a 60° (due passaggi in stufa sottovuoto di circa 1 ora ciascuno), lasciati solidificare a temperatura ambiente, e tagliati al microtomo in modo da ottenere sezioni di 7 μ di spessore. Quindi le fettine sono state montate su vetrini porta-oggetto con albumina glicerinata e lasciate ad essiccare per una notte mediante incubazione in stufa a 37°.

I vetrini così allestiti sono stati utilizzati sia per colorazioni istologiche, per una descrizione morfologica generale dei vari segmenti dell'apparato gastroenterico, sia per reazioni di immunoistochimica.

8.2. IMMUNOISTOCHIMICA

Per l'immunoistochimica è stato utilizzato il metodo perossidasi-antiperossidasi (PAP) secondo Sternberger (1986).

Antisieri primari:

1. Antisiero policlonale ottenuto in coniglio e diretto contro la sequenza C-terminale della grelina di ratto (H-031-31; Phoenix Pharmaceuticals; Belmont, CA, USA);

2. Antisiero policlonale ottenuto in coniglio e diretto contro un frammento della catena C-terminale della leptina umana (A-20: sc-842; Santa Cruz Biotech., CA);

3. Antisiero policlonale ottenuto in capra e diretto contro un frammento della catena C-terminale del GLP-1 umano (C-17: sc-7782; Santa Cruz Biotech., CA);

4. Antisiero policlonale ottenuto in capra e diretto contro un frammento della catena C-terminale della Orexina-A umana (C-19: sc-8070; Santa Cruz Biotech., CA);

5. Antisiero policlonale ottenuto in capra e diretto contro un frammento della catena C-terminale della Orexina-B umana (C-19: sc-8071; Santa Cruz Biotech., CA);

Antisieri secondari:

1. Antisiero policlonale ottenuto in capra per le IgG di coniglio (GAR; Z 0421; Dako Corporation, Calif.,USA);

2. Antisiero policlonale ottenuto in coniglio per le IgG di capra (RAG; 305-005-003; Jackson Immunoresearch Laboratories; West grove, Pa., USA);

Complesso perossidasi-antiperossidasi (PAP):

► Antisiero di IgG ottenuto in coniglio coniugato con la PAP (PAP_{rabbit}; Z 0113; Dako Corporation, Calif.,USA);

► Antisiero di IgG ottenuto in capra coniugato con la PAP (PAP_{goat}; B 0157; Dako Corporation, Calif.,USA).

Sieri normali:

- Siero normale di capra (NGS; S-1000; Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA);
- Siero normale di coniglio (NRS; 011-000-001; Jackson Immunoresearch Laboratories; West grove, Pa., USA);

Procedimento:

Le sezioni sono state deparaffinate mediante immersione in xilene (due passaggi di circa 10' ciascuno), reidratate attraverso il passaggio in concentrazioni decrescenti di etanolo (100°; 95°; 85°; 75°; 70°) e poi in acqua distillata, quindi sono state trattate secondo il seguente protocollo:

1. Forno a microonde, per smascherare i siti antigenici, con tampone citrato (0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0, per 10' a 750W), solo per le sezioni da incubare con leptina e GLP-1 (Reynolds et al., 1994);
2. acqua ossigenata al 3%, per 20 minuti a temperatura ambiente, per bloccare l'attività delle perossidasi endogene;
3. lavaggi in PBS (Phosphate buffer saline) 0.01 M, a pH 7.3-7.4, per circa 15 minuti a temperatura ambiente;

4. siero normale, NGS o NRS, diluito 1:5 per 30' a temperatura ambiente;
5. anticorpo primario diluito 1:750 (grelina); 1:50 (leptina); 1:300 (GLP-1); 1:500 (orexina-A/orexina-B) lasciato per circa 18 ore al buio in camera umida (+ 4°);
6. antisiero secondario, GAR o RAG, diluito 1:50 per 30' a temperatura ambiente;
7. lavaggi in PBS per circa 15 minuti a temperatura ambiente;
8. complesso perossidasi-antiperossidasi (PAP) in coniglio o capra (a seconda dell'anticorpo primario) diluito 1:100 per 30' a temperatura ambiente.

La reazione della perossidasi è stata, quindi, visualizzata con una soluzione costituita da 10µg di 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma; D 5905) disciolti in 15ml di Tris buffer a pH 7.6, contenente 1.5ml di acqua ossigenata allo 0.03%, lasciata per 30'/45' a temperatura ambiente ed al buio.

La specificità delle reazioni è stata testata: 1) sostituendo l'anticorpo primario od il secondario od il complesso PAP con PBS (controllo negativo); 2) incubando l'anticorpo primario con tessuti conosciuti come positivi ai vari anticorpi utilizzati (controllo positivo); 3)

adsorbendo l'anticorpo primario con una quantità in eccesso di antigene omologo (50 mg/ml) o di antigene eterologo (100 mg/ml).

Le sezioni così colorate sono state, infine, disidratate in concentrazioni crescenti di etanolo, montate con Balsamo di Canada ed osservate al microscopio ottico Leitz Aristoplan, equipaggiato con una fotocamera digitale Leica DC300F.

CAPITOLO 9

RISULTATI

9.1. GRELINA

9.1.1. *Gallus domesticus*

Cellule immunopositive alla grelina sono state osservate nello strato mucoso di tutti i segmenti del tratto gastrointestinale esaminati: proventricolo, duodeno, digiuno, ileo, ciechi e coloretto.

Numerose cellule, intensamente immunoreattive, sono state riscontrate in corrispondenza dei lobuli ghiandolari del proventricolo (Fig. 1A); al contrario, poche cellule positive, con un'intensa immunoreattività limitata alla regione basale del citoplasma, sono state trovate a livello della zona basale delle pliche del proventricolo (Fig. 1B, E). La maggior parte di queste cellule si sono presentate di piccole dimensioni e di forma rotondeggiante, e perciò sono state denominate "cellule di tipo chiuso" (Fig. 1C); altre cellule, meno numerose, hanno mostrato, invece, una forma leggermente allungata ed un processo citoplasmatico in contatto con il lume, tanto è che sono state definite "cellule di tipo aperto" (Fig. 1D).

Nel duodeno molte cellule immunoreattive alla grelina, sia di tipo aperto che di tipo chiuso, sono state osservate nell'epitelio delle cripte e lungo i villi intestinali (Fig. 2A, B, E). Procedendo verso le

porzioni distali dell'intestino, il numero di cellule positive è andato progressivamente riducendosi. Infatti, poche cellule immunoreattive, per lo più di tipo chiuso, sono state trovate nell'epitelio delle cripte del digiuno e dell'ileo (Fig. 2C). Ancor meno numerose sono state le cellule positive alla grelina riscontrate nelle cripte del grosso intestino. Esse si sono presentate per lo più di tipo chiuso e di forma triangolare (Fig. 2D).

9.1.2. *Dicentrarchus labrax*

Immunoreattività alla grelina è stata rinvenuta sia nello stomaco che nei vari segmenti intestinali, sebbene il maggior numero di cellule positive sia stato osservato nella mucosa gastrica.

Diverse cellule intensamente immunoreattive alla grelina e di forma allungata, sono state osservate nella porzione superiore delle pieghe epiteliali e delle ghiandole gastriche della regione cardiaca (Fig. 3A). La positività a volte ha interessato singoli corpi cellulari, altre volte piccoli gruppi di due o tre elementi. Nel cieco gastrico numerose cellule positive sono state riscontrate in corrispondenza delle ghiandole gastriche. Talvolta queste cellule hanno mostrato un lungo processo citoplasmatico, fortemente immunoreattivo, in contatto con la lamina basale (Fig. 3B). Inoltre, sia nella porzione cardiaca che nel cieco gastrico, sono state osservate rare fibre nervose immunoreattive alla grelina, localizzate negli strati di muscolatura longitudinale e

circolare, nonché nel plesso mienterico e nel plesso sottomucoso, soprattutto in prossimità di vasi sanguigni. Il maggior numero di cellule intensamente immunoreattive alla grelina è stato, però, osservato in corrispondenza della porzione pilorica, lungo il margine superiore delle pieghe gastriche (Fig. 3C). Alcune di queste cellule, di forma grossolanamente ovoidale, hanno mostrato un processo basale a diretto contatto con l'asse connettivale delle pieghe gastriche. Sempre in questa porzione, piccoli neuroni positivi e fibre immunoreattive sono state osservate nel plesso mienterico, in prossimità di strutture vascolari.

Procedendo caudalmente, verso i ciechi pilorici, l'intestino anteriore e l'intestino medio, le cellule immunoreattive alla grelina sono diventate progressivamente meno numerose. Tali cellule sono state osservate nell'epitelio di rivestimento dei villi mostrando nella quasi totalità dei casi una forma allungata, tipica delle cellule endocrine, con un caratteristico terminale bottoniforme intensamente reattivo (Fig. 3D, E; Fig. 4A, B). Inoltre, in questi segmenti è stata riscontrata immunoreattività di piccoli neuroni e fibre nervose nel plesso mienterico in corrispondenza dei vasi sanguigni. Rare cellule immunoreattive alla grelina sono state riscontrate nei villi intestinali dell'intestino posteriore. Talvolta queste cellule hanno mostrato una intensa immunoreattività localizzata ad entrambi i processi citoplasmatici, basale ed apicale. Sono, infine, risultate positive

anche sottili fibre nervose del plesso mienterico e della muscolatura longitudinale (Fig. 4C).

9.1.3. *Carassius auratus*

Immunoreattività alla grelina è stata riscontrata in tutto il segmento intestinale. In particolare, nell'intestino anteriore, rare e diffuse cellule immunoreattive alla grelina sono state osservate alla base delle pieghe della mucosa intestinale (Fig. 5B). Alcune di queste cellule, sebbene di forma più allungata e sottile rispetto a quelle rinvenute nel *Dicentrarchus labrax*, hanno mostrato comunque uno o due processi citoplasmatici. Quando sono risultati visibili entrambi, il processo basale era sottile e a stretto contatto con la lamina basale, mentre quello apicale era più allungato, munito di un terminale bottoniforme e proteso verso il lume (Fig. 5D). Data la localizzazione profonda nell'ambito della mucosa, molto spesso è stato possibile osservare solamente una porzione del processo apicale. Inoltre in questo segmento è stata rilevata immunoreattività anche di alcune fibre nervose, soprattutto in prossimità di gangli negativi appartenenti al plesso mienterico (Fig. 5C). Meno numerose e diffuse sono state, invece, le cellule positive riscontrate in corrispondenza dell'intestino medio e dell'intestino posteriore. In questi segmenti, né il plesso mienterico, né la sottomucosa hanno mostrato fibre nervose immunoreattive alla grelina.

9.2. LEPTINA

9.2.1. *Gallus domesticus*

Cellule immunoreattive alla leptina sono state osservate nell'intero tratto gastroenterico esaminato. In particolare, nello stomaco ghiandolare è stata riscontrata una diffusa ed intensa immunoreattività nell'epitelio di rivestimento delle pliche mucose (Fig. 6A). Le cellule epiteliali positive si sono presentate sottili ed allungate, con l'accumulo di materiale citoplasmatico fortemente immunoreattivo nella porzione apicale. Oltre che nell'epitelio mucosecernente, un discreto numero di cellule immunoreattive alla leptina è stato rinvenuto anche nell'epitelio delle ghiandole tubulari composte (Fig. 6B). In tale sede sono risultate positive sia cellule secernenti colonnari basse, identificate con le cellule ossintopeptiche, sia cellule tipicamente endocrine, per la caratteristica forma sottile ed allungata e per la presenza di un prolungamento citoplasmatico a contatto con il lume (Fig. 6C, D).

Nel duodeno numerose cellule immunoreattive alla leptina sono state riscontrate lungo tutto l'epitelio di rivestimento dei villi (Fig. 7A). Tali cellule, si sono presentate di forma cilindrica, alte e strette, con una intensa immunoreattività localizzata alla porzione apicale (Fig. 7C). Altre cellule positive, meno numerose rispetto alle precedenti, sono state rinvenute nella porzione basale delle ghiandole (Fig. 7B). Si sono presentate di forma grossolanamente ovoidale, leggermente

allungata, con un prolungamento a contatto con il lume. Sulla base delle caratteristiche morfologiche, il primo tipo cellulare è stato identificato con le cellule principali, il secondo con cellule endocrine. Allo stesso modo, procedendo caudalmente, verso il digiuno e l'ileo, è stata osservata una diffusa ed intensa immunoreattività delle cellule epiteliali principali lungo tutto l'asse del villo, mentre, le cellule endocrine positive sono apparse meno numerose e debolmente reattive (Fig. 7D). Nei ciechi è stato rinvenuto un discreto numero di cellule positive sia lungo l'asse dei villi che in corrispondenza della porzione basale delle ghiandole (Fig. 7E, F, G). Le cellule endocrine, seppure con una reattività meno intensa, hanno mostrato una morfologia grossomodo sovrapponibile a quelle descritta nei precedenti segmenti del tratto gastroenterico a differenza delle cellule epiteliali che si sono mostrate più basse e tozze. Infine, verso le porzioni distali del grosso intestino, sono state rinvenute solo rare cellule endocrine positive, debolmente reattive, nelle strutture ghiandolari profonde (Fig. 7H, I).

9.2.2. *Dicentrarchus labrax*

Elementi cellulari, corpi neuronali e fibre nervose immunoreattive alla leptina sono state osservate nell'intero tratto gastroenterico di spigola.

Nella porzione cardiaca dello stomaco una diffusa ed intensa immunoreattività è stata rilevata in corrispondenza della porzione basale delle ghiandole gastriche (Fig. 8A, B). Un discreto numero di cellule positive è stato rinvenuto anche nell'epitelio di rivestimento delle pliche mucose. Tali cellule distribuite lungo il margine delle pliche ed addensate in corrispondenza della sommità delle stesse, si sono presentate di forma grossolanamente ovoidale ed allungata (Fig. 8C). Inoltre, verso la porzione basale delle pliche sono state osservate diverse cellule immunoreattive alla leptina, sempre di tipo endocrino, ma più piccole delle precedenti e di forma per lo più tondeggianti (Fig. 8D). Inoltre, è risultato positivo anche un discreto numero di fibre nervose che corrono nello strato circolare della tunica muscolare (Fig. 8E). Nel cieco gastrico, il numero di cellule endocrine positive si è ridotto, così come la densità di fibre nervose immunoreattive nella circolare; inoltre, in questa porzione, rare fibre positive sono state rinvenute nella tunica sottomucosa. Nella regione pilorica l'immunoreattività si è limitata a poche fibre della sottomucosa e a qualche neurone del plesso mienterico (Fig. 8F).

Nei segmenti intestinali il pattern di distribuzione della immunoreattività, ristretta a fibre e a corpi cellulari nervosi, è stato grossomodo sovrapponibile. Infatti, sono state rinvenute numerose fibre, intensamente reattive alla leptina, negli strati circolare e longitudinale della tunica muscolare e nel plesso mienterico (Fig. 9A, B). Inoltre, nel plesso mienterico è stato osservato anche qualche corpo neuronale positivo.

9.2.3. *Carassius auratus*

In questa specie l'immunoreattività alla leptina, limitata a fibre nervose e a pochi elementi cellulari dell'epitelio mucoso, ha mostrato un medesimo pattern di distribuzione nell'intero segmento intestinale. Infatti, sia nell'intestino anteriore che in quello medio e posteriore, fibre intensamente reattive alla leptina sono state riscontrate nelle tuniche sottomucosa e muscolare (Fig. 9C). In particolare, nella sottomucosa è stato osservato un discreto numero di fibre immunoreattive alla leptina; il maggior numero di fibre positive è stato rinvenuto nello strato longitudinale della muscolare (Fig. 9D), mentre decisamente scarse sono state le fibre immunoreattive riscontrate nello strato circolare. Oltre alla immunoreattività delle fibre nervose, nei segmenti anteriore e medio, sono risultate positive anche poche cellule dell'epitelio di rivestimento

dei villi. Tali cellule si sono presentate strette ed allungate e particolarmente concentrate lungo la sommità dei villi (Fig. 9E).

9.4. OREXINE

9.4.1. *Gallus domesticus*

Nel tratto gastroenterico di *Gallus domesticus* l'immunoreattività all'orexina-A e alla orexina-B è stata decisamente ubiquitaria.

Numerose cellule intensamente immunoreattive all'orexina-A sono state osservate nell'epitelio di rivestimento delle ghiandole tubulari del proventriglio (Fig. 12A). Tali cellule si sono presentate per lo più di forma tondeggiate; solo raramente hanno mostrato un prolungamento citoplasmatico in contatto con il lume. In entrambi i casi, comunque, in virtù della localizzazione e delle caratteristiche morfologiche si è trattato di cellule tipicamente endocrine.

Nel piccolo intestino l'immunoreattività è andata scemando. Infatti, nel duodeno sono state riscontrate rare e piccole cellule tondeggianti immunoreattive all'orexina-A in corrispondenza della porzione profonda delle ghiandole tubulari (Fig. 12B). Nell'ileo e nel digiuno le cellule positive all'orexina-A sono diventate rarissime: in tali segmenti l'immunoreattività è stata osservata in corrispondenza dell'epitelio di rivestimento ghiandolare ed alla base dei villi. Nel

grosso intestino, infine, diverse cellule immunoreattive all'orexina-A sono state rinvenute esclusivamente nell'epitelio di rivestimento dei villi dei ciechi. La maggior parte si è presentata di forma rotondeggiante, alcune, soprattutto in corrispondenza della sommità dei villi, di forma allungata (Fig. 12C).

Immunoreattività all'orexina-B è stata osservata soltanto nell'ileo e nel cieco. Rare cellule positive all'orexina-B, di forma tondeggiate e di piccole dimensioni, sono state rinvenute nell'epitelio di rivestimento dei villi e nella porzione profonda delle ghiandole tubulari dell'ileo (Fig. 12D). Il maggior numero di cellule positive è stato però rinvenuto nel cieco. Tali cellule, per lo più di forma allungata, sono state osservate nell'epitelio ghiandolare e nell'epitelio di rivestimento dei villi (Fig. 12E, F).

9.4.2. *Dicentrarchus labrax*

Cellule immunoreattive alla orexina-A sono state osservate nello strato mucoso dello stomaco e dei vari segmenti intestinali.

Diverse cellule positive, per lo più di forma tondeggiate o leggermente ovalare, sono state riscontrate nella porzione superiore e nel terzo medio delle pieghe mucose della regione cardiaca (Fig. 13A, B, C); il maggior numero di cellule immunoreattive all'orexina-A è stato, però, rilevato in corrispondenza delle strutture ghiandolari della porzione pilorica (Fig. 13D). Tali cellule si sono presentate di

forma allungata e sottile con un terminale slargato (bottoniforme), intensamente reattivo, che contatta il lume (Fig. 13E). Inoltre, negli strati longitudinale e circolare della tunica muscolare sono state rinvenute sottili fibre nervose e qualche neurone positivo.

Nell'intestino anteriore, numerose cellule immunoreattive all'orexina-A sono state osservate maggiormente nella porzione medio-basale dell'epitelio di rivestimento dei villi (Fig. 14A). Tutte le cellule positive hanno mostrato di possedere un lungo prolungamento citoplasmatico, fortemente reattivo, rivolto in alcuni casi verso il lume, ed in altri verso la lamina basale. Procedendo caudalmente, il numero di cellule immunoreattive all'orexina-A è andato decisamente scemando. Sia nell'intestino medio che nel posteriore, sono state osservate rare cellule positive, per lo più di forma allungata, nella porzione basale dell'epitelio di rivestimento dei villi (Fig. 14B, C). Nel segmento medio sono stati, inoltre, evidenziati diversi neuroni e fibre nervose reattive del plesso mienterico, sempre in corrispondenza di strutture vascolari; qualche fibre positiva è stata rinvenuta anche nello strato circolare della tunica muscolare.

Immunoreattività all'orexina-B è stata rinvenuta nell'intero tratto gastroenterico. In particolare, sia nella regione cardiaca che nel cieco gastrico, sono state osservate diverse cellule positive, concentrate all'apice e/o lungo il margine dell'epitelio di rivestimento delle pieghe mucose (Fig. 15A). Alcune si sono presentate

tondeggianti od ovalari, altre di forma allungata con un prolungamento citoplasmatico fortemente reattivo rivolto verso il lume gastrico (Fig. 15B). Il maggior numero di cellule immunoreattive all'orexina-B è stato rinvenuto in corrispondenza della regione pilorica, soprattutto lungo il margine delle pieghe mucose (Fig. 15C). Anche in questa porzione dello stomaco, alcune cellule hanno mostrato una forma grossolanamente tondeggiante, altre più allungata.

Una discreta immunoreattività all'orexina-B è stata osservata anche nell'intestino anteriore. Diverse cellule positive, per lo più di forma tondeggiante, sono state rinvenute nella porzione basale dell'epitelio di rivestimento dei villi (Fig. 16A). Nei segmenti medio e posteriore sono state osservate rare cellule immunoreattive all'orexina-B nell'epitelio mucoso alla base dei villi e qualche neurone positivo nella tunica sottomucosa e nel plesso mienterico (Fig. 16B, C).

9.4.3. *Carassius auratus*

Nei segmenti intestinali di *Carassius auratus* è stata osservata immunoreattività di corpi cellulari e fibre nervose ad entrambe le orexine.

Nell'intestino anteriore un discreto numero di cellule positive all'orexina-A è stato rinvenuto alla base dell'epitelio di rivestimento di

villi (Fig. 17A). Tali cellule si sono presentate in maggior numero di forma allungata, con un prolungamento a contatto con il lume (Fig. 17B). Nei segmenti medio e posteriore le cellule immunoreattive all'orexina-A sono divenute decisamente più rare, tanto che a volte è stato possibile rilevare solamente degli apici cellulari. Nell'intero intestino è stata rilevata una certa immunoreattività di fibre nervose e di corpi gangliari, in corrispondenza sia dello strato circolare della tunica muscolare che del plesso mienterico (Fig. 17C).

L'immunoreattività all'orexina-B ha ricalcato grossomodo la distribuzione descritta per l'orexina-A. Infatti, diverse cellule positive, con un prolungamento a contatto con il lume, sono state osservate alla base dell'epitelio di rivestimento mucoso dell'intestino anteriore (Fig. 18A) Procedendo caudalmente, l'immunoreattività all'orexina-B è divenuta meno evidente, riuscendo a rilevare solamente degli apici cellulari. Anche per l'orexina-B è stata rilevata un certo grado di immunoreattività sia di corpi gangliari che di sottili fibre nervose nello strato longitudinale della tunica muscolare e nel plesso mienterico (Fig. 18B, C).

9.3. GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1)

9.3.1. *Gallus domesticus*

Cellule immunoreattive al GLP-1 sono state osservate esclusivamente nell'ileo superiore e nell'ileo inferiore del tratto gastroenterico di Pollo. Infatti, né il proventriglio, né gli altri segmenti del piccolo e del grosso intestino hanno mostrato immunoreattività degli elementi cellulari o delle fibre nervose.

Nell'ileo superiore un discreto numero di cellule uniformemente immunoreattive al GLP-1 è stato rinvenuto nella porzione basale delle ghiandole tubulari (Fig. 10A). La maggior parte delle cellule si sono presentate strette ed allungate, con un prolungamento a contatto con il lume contenente molteplici piccoli granuli positivi (Fig. 10B), mentre altre sono apparse più piccole, di forma ovoidale, tondeggianti o talvolta anche triangolare, e con un citoplasma densamente reattivo (Fig. 10C). Rare cellule immunoreattive sono state rinvenute anche lungo l'epitelio mucoso dei villi. Tali cellule si sono presentate strette ed allungate, e munite di un duplice prolungamento citoplasmatico: uno basale, a stretto contatto con la membrana basale, ed uno apicale a contatto con il lume (Fig. 10D). Verso l'ileo inferiore, il numero di cellule positive è andato decisamente aumentando. Molto numerose, infatti, sono state le cellule endocrine immunoreattive osservate in corrispondenza della regione basale delle ghiandole (Fig. 10E). Il tipo cellulare ricorrente

con maggiore frequenza è stato quello triangolare o allungato, munito di un processo citoplasmatico che contatta il lume ghiandolare. Inoltre, sono risultate immunoreattive, anche se in numero inferiore rispetto alle precedenti, diverse cellule dell'epitelio di rivestimento mucoso dei villi (Fig. 10F). Queste cellule, talvolta hanno mostrato una forma allungata con un prolungamento basale ed uno apicale, altre volte una forma grossolanamente tondeggiante.

9.3.2. *Dicentrarchus labrax*

Nel *Dicentrarchus labrax* immunoreattività al GLP-1, limitata alle fibre nervose e a pochi elementi cellulari, è stata osservata solo nel distretto intestinale. In particolare, nell'intestino anteriore e nell'intestino medio sono risultate fortemente immunoreattive numerose fibre del plesso mienterico e della muscolare (Fig.A, B). Decisamente scarsa è risultata l'immunoreattività delle fibre nell'intestino posteriore. Inoltre, nei segmenti distali sono state rinvenute rare cellule positive di forma allungata e munite di un duplice prolungamento, uno rivolto verso il lume, l'altro verso la lamina basale (Fig. 11C, D).

9.3.3. *Carassius auratus*

Nel *Carassius auratus* l'immunoreattività al GLP-1 ha interessato esclusivamente corpi neuronali e fibre nervose. Infatti, soprattutto nell'intestino medio, sono stati osservati un discreto numero di neuroni positivi e numerose fibre nervose, fortemente reattive al GLP-1, in corrispondenza del plesso mienterico (Fig. 11E). Procedendo verso l'intestino posteriore sono risultate immunoreattive solamente rare fibre disposte nello strato circolare della tunica muscolare.

TAVOLE FOTOGRAFICHE

TAVOLE FOTOGRAFICHE

TAVOLA 1

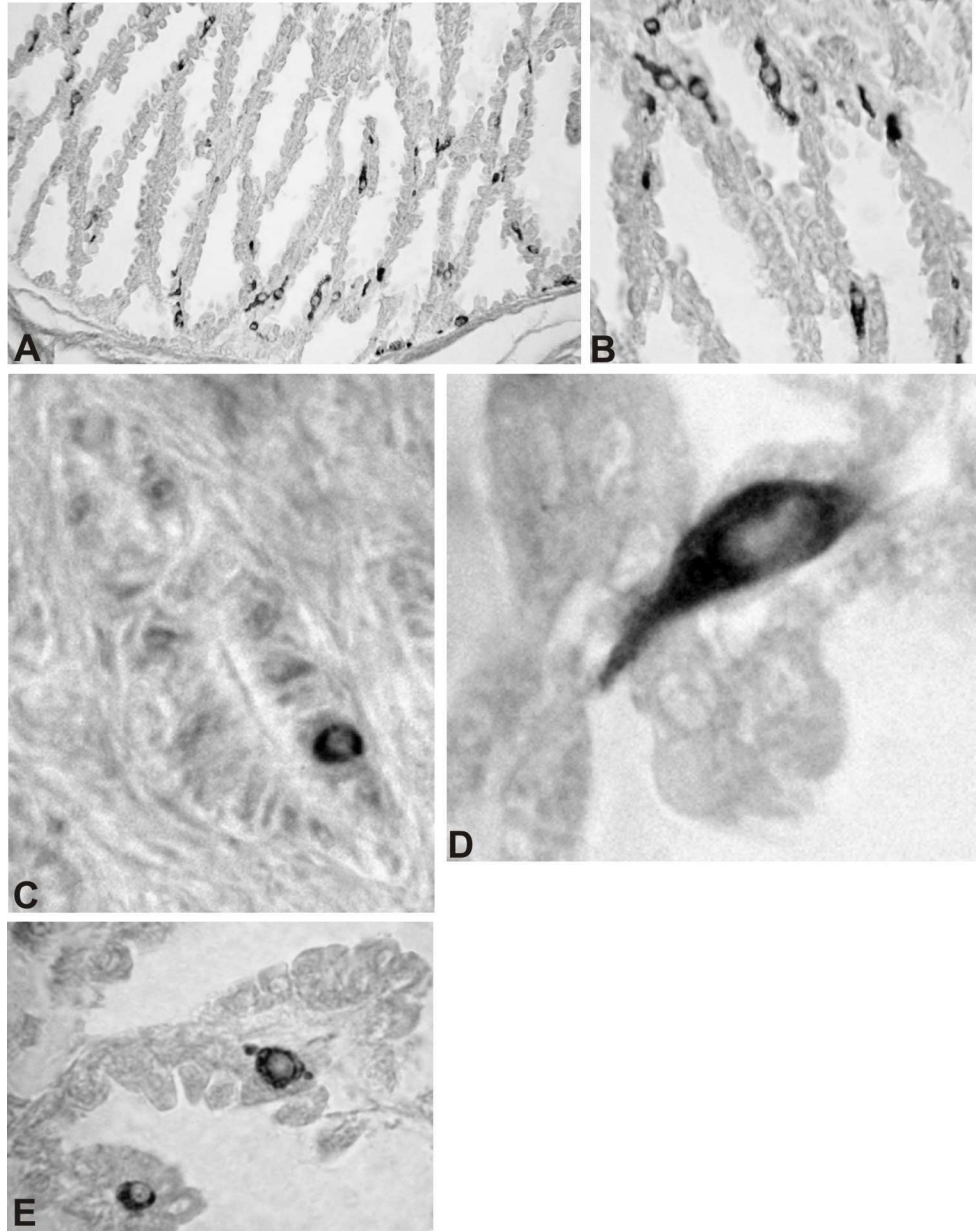


TAVOLA 1 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA GRELINA NEL PROVENTRIGLIO DI *GALLUS DOMESTICUS*.

Fig. A (x80), B (x150). Cellule immunoreattive alla grelina nello strato mucoso alla base dei lobuli ghiandolari.

Fig. C (x260). Cellule immunoreattive alla grelina di tipo chiuso nella zona basale delle pliche.

Fig. D (x450). Cellule immunoreattive alla grelina di tipo aperto, di forma affusolata, con un processo citoplasmatico apicale a contatto con il lume.

Fig. E (x220). Cellule immunoreattive alla grelina di tipo chiuso, prive di connessione con il lume, di forma arrotondata e con una intensa immunoreattività localizzata nella regione basale del citoplasma.

TAVOLA 2

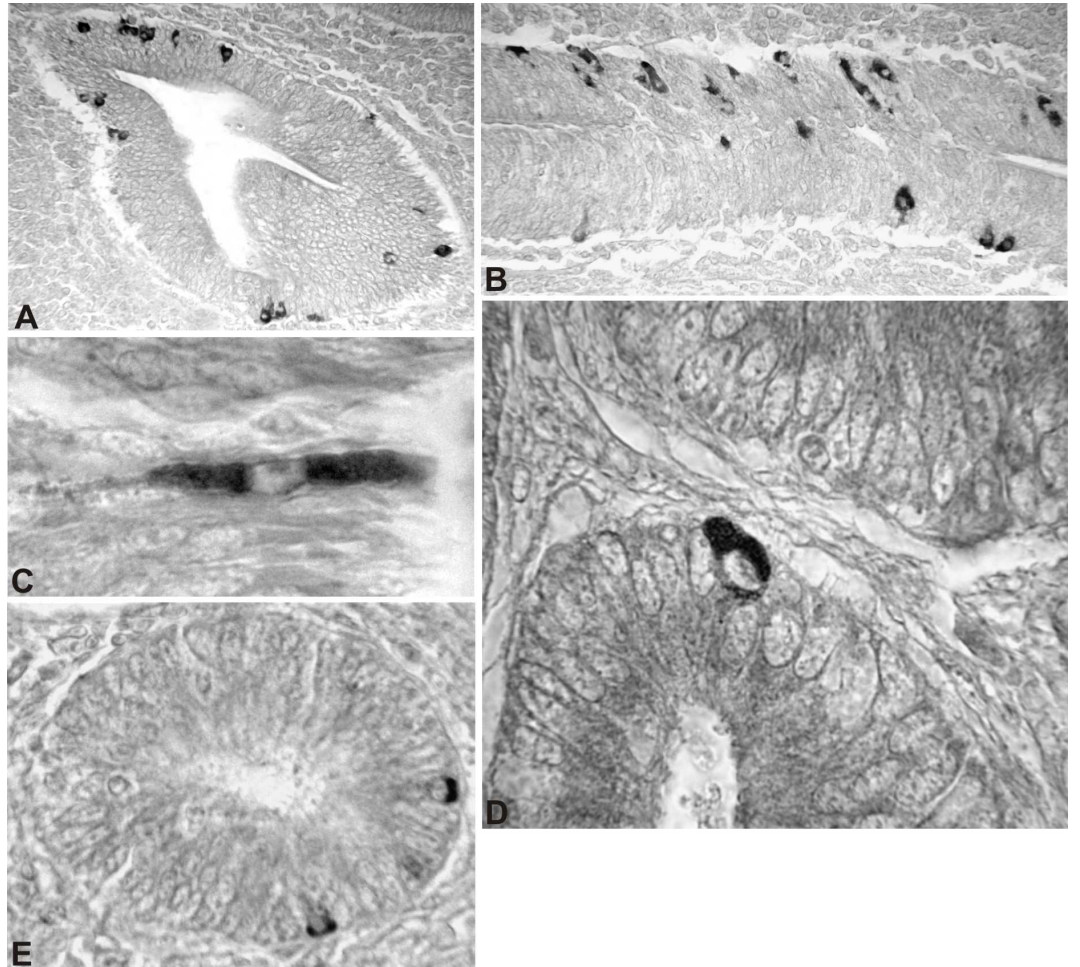


TAVOLA 2 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA GRELINA NEL PICCOLO E NEL GROSSO INTESTINO DI GALLUS DOMESTICUS.

Fig. A (x60). Cellule immunoreattive alla grelina nelle cripte del duodeno.

Fig. B (x130). Cellule immunoreattive alla grelina lungo i villi del duodeno.

Fig. C (x300). Cellule immunoreattive alla grelina di tipo chiuso nelle cripte del digiuno.

Fig. D (x280). Cellule immunoreattive alla grelina di tipo chiuso e di forma triangolare nelle cripte del colo-retto.

Fig. E (x220). Duodeno. Cellule di tipo aperto e di forma allungata, con un processo citoplasmatico apicale a contatto con il lume.

TAVOLA 3

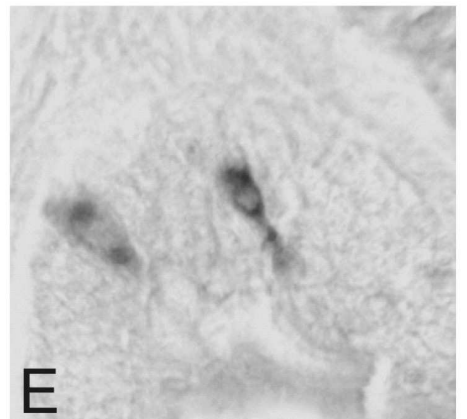
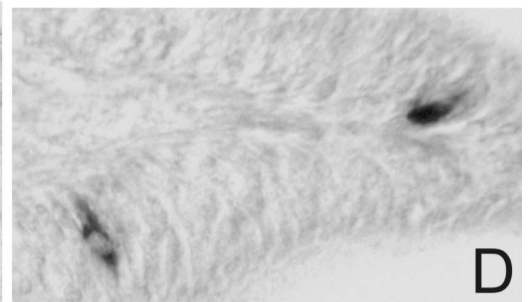
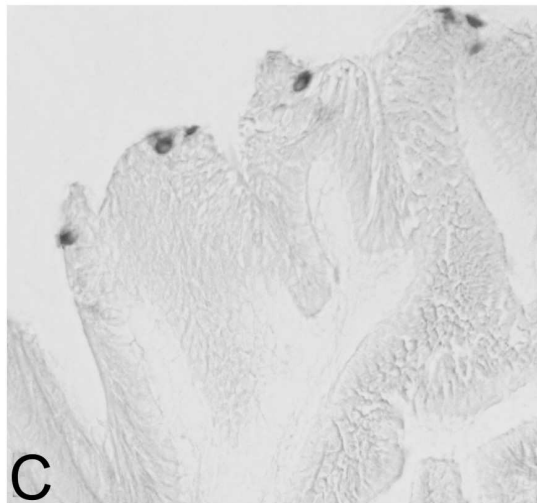
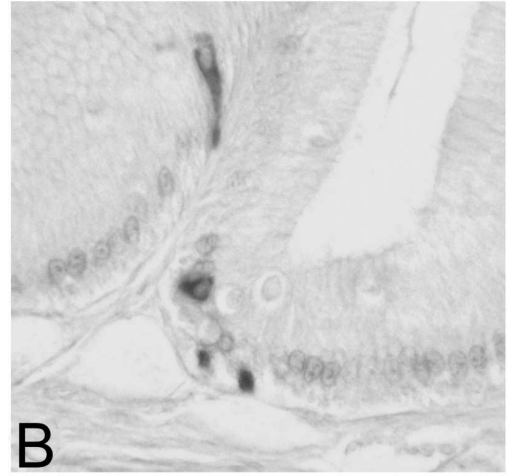
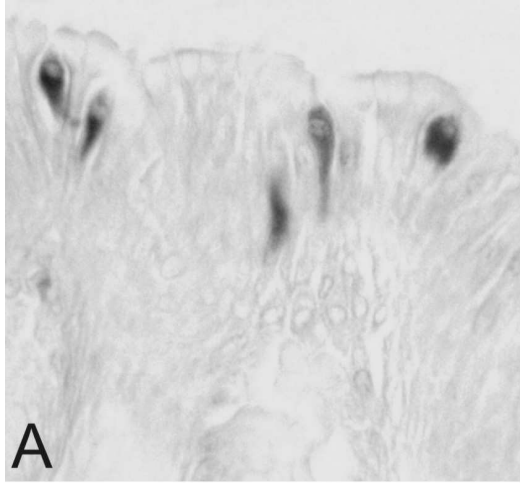


TAVOLA 3 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA GRELINA NELLO STOMACO DI *DICENTRARCHUS LABRAX*.

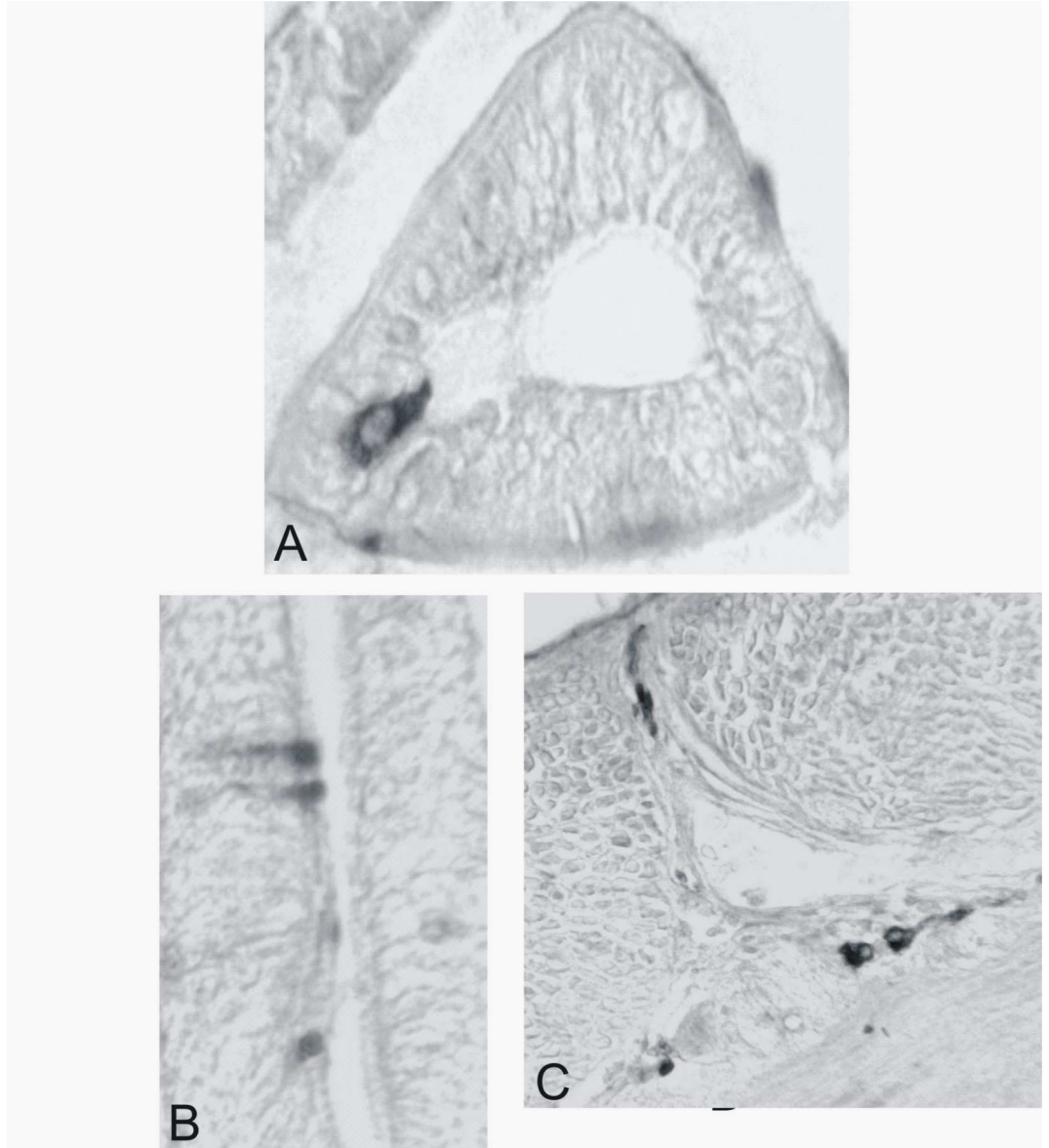
Fig. A (x220). Cellule immunoreattive alla grelina di forma allungata nella porzione superiore delle pieghe epiteliali della regione cardiale.

Fig. B (x220). Cellule immunoreattive alla grelina di forma allungata, con un prolungamento fortemente immunoreattivo a contatto con la lamina basale nelle ghiandole del cieco gastrico.

Fig. C (x130). Cellule immunoreattive alla grelina di forma ovoidale lungo il margine superiore delle pieghe gastriche della regione pilorica.

Fig. D (x220), E (x220). Cellule immunoreattive alla grelina di forma allungata nei ciechi pilorici.

TAVOLA 4



**TAVOLA 4 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA
GRELINA NELL'INTESTINO DI *DICENTRARCHUS*
LABRAX.**

Fig. A (x300). Cellule immunoreattive alla grelina di forma allungata, con un processo citoplasmatico a contatto con il lume dell'intestino anteriore.

Fig. B (x260). Cellule immunoreattive alla grelina di forma allungata, con un terminale bottoniforme intensamente reattivo lungo i villi dell'intestino medio.

Fig. C (x280). Neuron e fibre nervose immunoreattivi alla grelina nel plesso mienterico intestinale.

TAVOLA 5

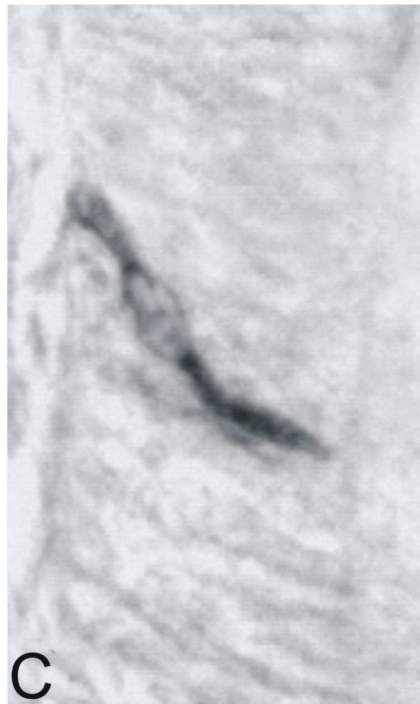
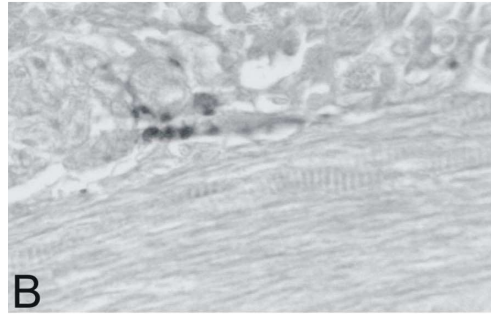
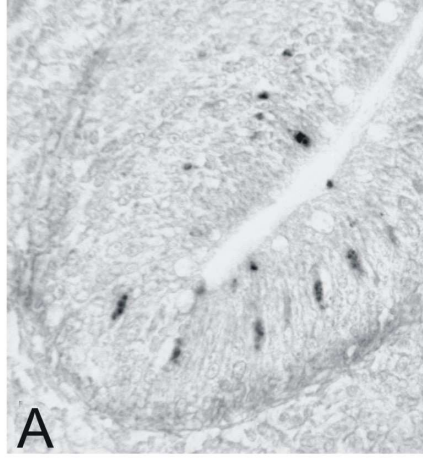


TAVOLA 5 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA GRELINA NELL'INTESTINO DI *CARASSIUS AURATUS*

Fig. A (x150). Cellule immunoreattive alla grelina di forma allungata alla base delle pieghe mucose dell'intestino anteriore.

Fig. B (x300). Fibre nervose reattive alla grelina in prossimità di gangli negativi del plesso mienterico nell'intestino anteriore.

Fig. C (x350). Cellula immunoreattiva alla grelina di forma allungata, munita di un sottile processo basale a contatto con la lamina basale e di un processo apicale, caratterizzato da un terminale bottoniforme proteso verso il lume.

TAVOLA 6

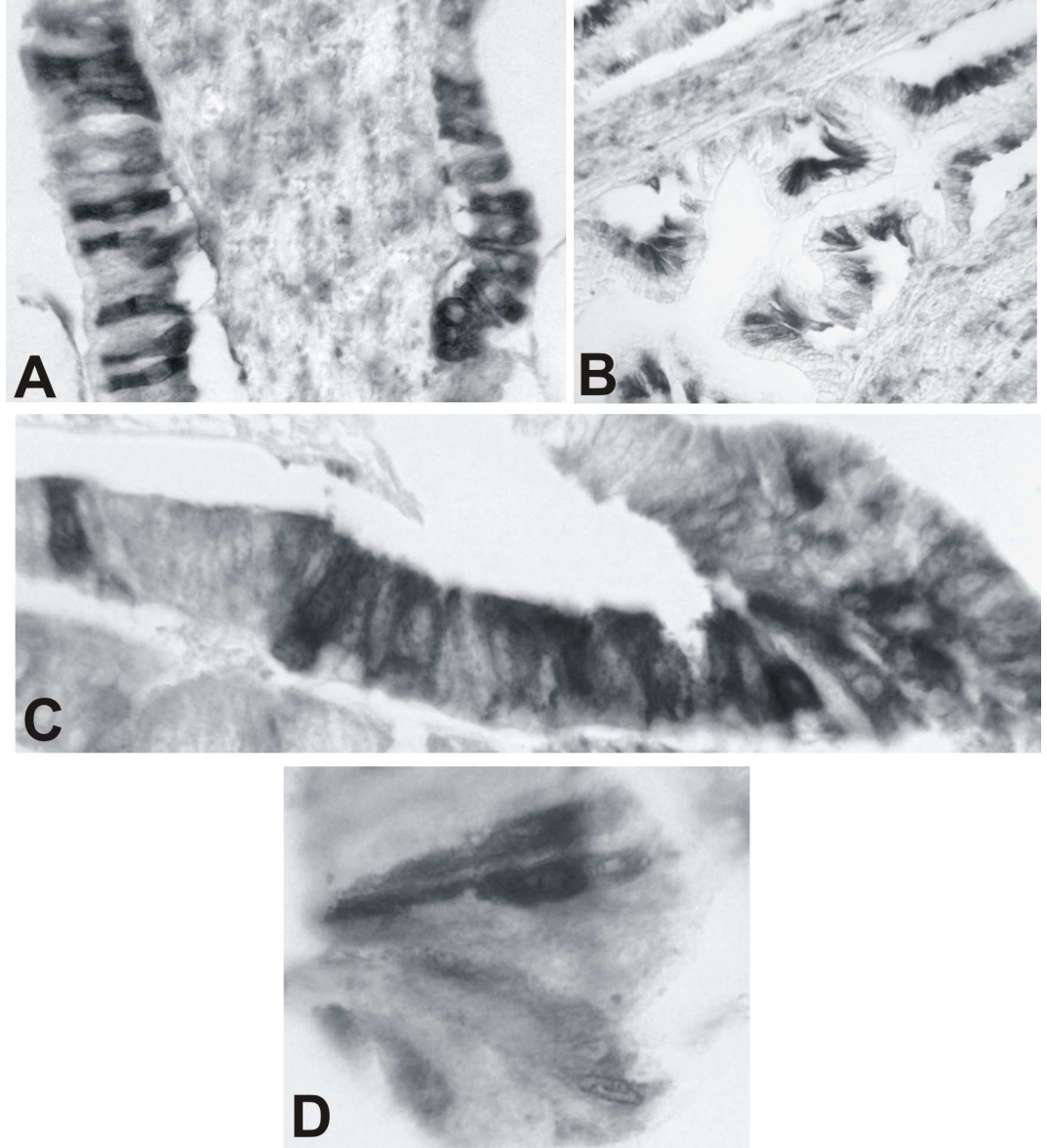


TAVOLA 6 (A-D). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA LEPTINA NEL PROVENTRIGLIO DI *GALLUS DOMESTICUS*

Fig. A (x220). Cellule immunoreattive alla leptina, sottili ed allungate nell'epitelio muco-secerente del proventriglio.

Fig. B (x130). Cellule immunoreattive alla leptina nell'epitelio delle ghiandole tubulari composte del proventriglio.

Fig. C (x300). Cellule ossinto-peptiche immunoreattive alla leptina, di forma colonnare bassa, nell'epitelio delle ghiandole tubulari composte del proventriglio.

Fig. D (x450). Cellule endocrine immunoreattive alla leptina, di forma sottile ed allungata, con un prolungamento citoplasmatico a contatto con il lume, nell'epitelio delle ghiandole tubulari composte del proventriglio.

TAVOLA 7

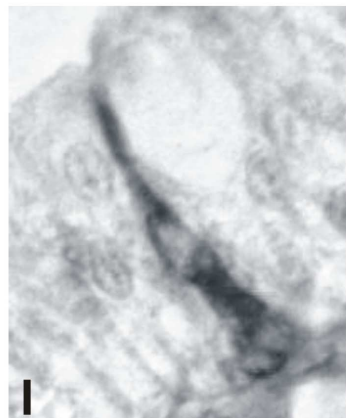
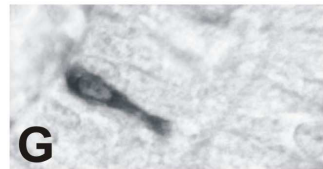
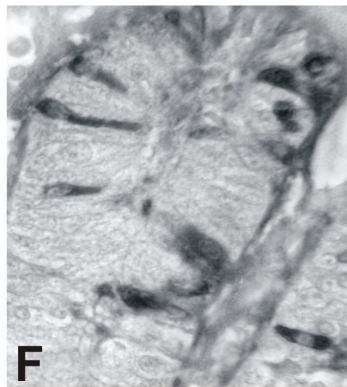
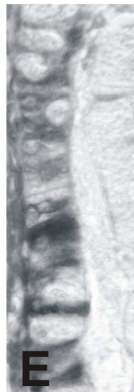
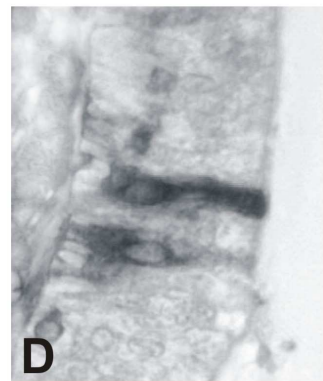
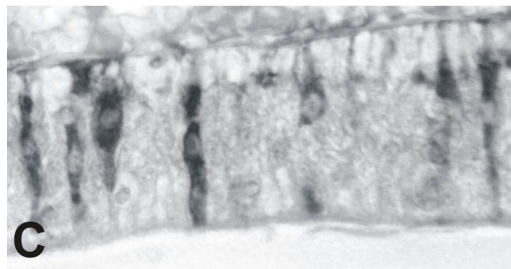
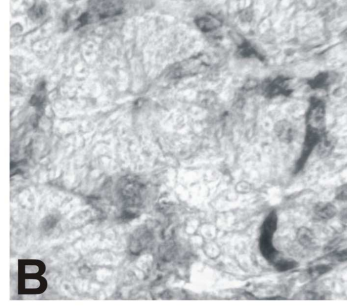
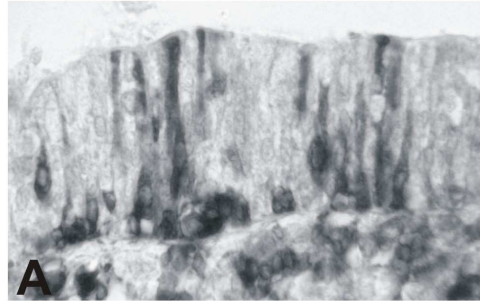


TAVOLA 7 (A-I). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA LEPTINA NELL'INTESTINO DI *GALLUS DOMESTICUS*

Fig. A (x240). Cellule immunoreattive alla leptina lungo l'epitelio di rivestimento dei villi del duodeno.

Fig. B (x220). Cellule endocrine immunoreattive alla leptina, di forma ovoidale ed allungata, nella porzione basale dell'epitelio ghiandolare del duodeno.

Fig. C (x300). Cellule principali immunoreattive alla leptina, di forma cilindrica, alte e strette, nell'epitelio di rivestimento dei villi del duodeno.

Fig. D (x400). Cellule principali e cellule endocrine immunoreattive alla leptina nell'epitelio di rivestimento dei villi del digiuno e dell'ileo.

Fig. E (x180). Cellule principali immunoreattive alla leptina, basse e tozze, lungo l'epitelio di rivestimento dei villi dei ciechi.

Fig. F (x220). Cellule immunoreattive alla leptina nella porzione basale delle ghiandole dei ciechi.

Fig. G (x300). Cellula immunoreattiva alla leptina, di forma ovoidale ed allungata, nella porzione basale delle ghiandole dei ciechi.

Fig. H (x300). Cellule immunoreattive alla leptina nelle strutture ghiandolari profonde del grosso intestino.

Fig. I (x450). Cellula immunoreattiva alla leptina, di forma allungata e sottile nelle strutture ghiandolari profonde del grosso intestino.

TAVOLA 8

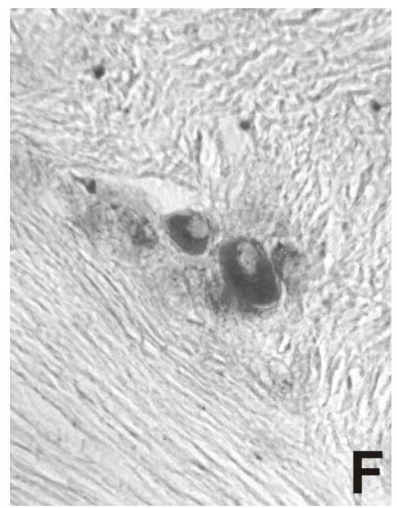
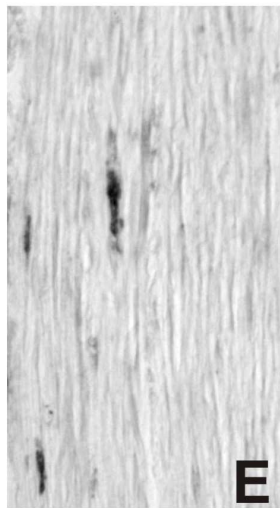
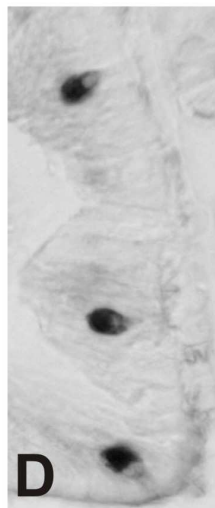
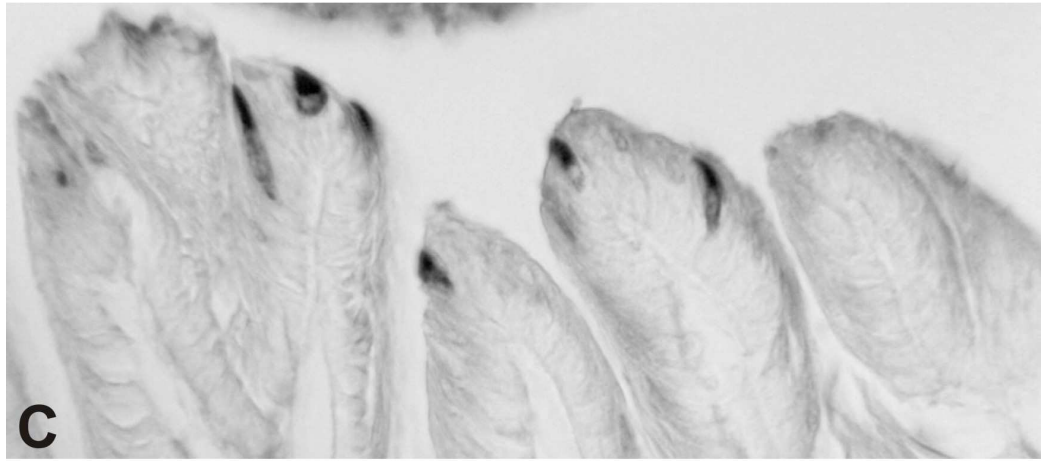
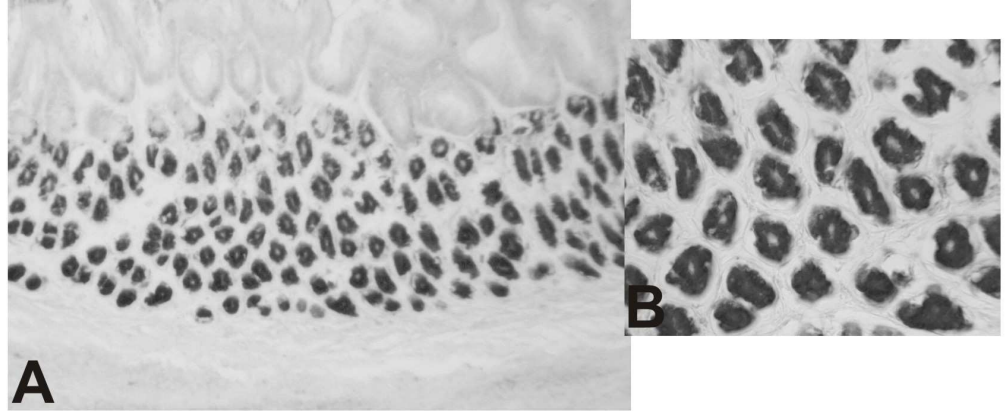


TAVOLA 8 (A-F). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA LEPTINA NELLO STOMACO DI *DICENTRARCHUS LABRAX*

Fig. A (x150), B (x300). Ghiandole gastriche uniformemente reattive alla leptina nella regione cardiaca dello stomaco.

Fig. C (x220). Cellule immunoreattive alla leptina, di forma ovoidale ed allungate, lungo la sommità dell'epitelio di rivestimento delle pliche mucose nella regione cardiaca dello stomaco.

Fig. D (x220). Cellule immunoreattive alla leptina, di forma tondeggianti, nella porzione basale delle pliche mucose nella regione cardiaca dello stomaco.

Fig. E (x220). Fibre nervose immunoreattive alla leptina nello strato circolare della tunica muscolare della regione cardiaca dello stomaco.

Fig. F (x220). Neuroni immunoreattivi alla leptina nel plesso mienterico della regione pilorica dello stomaco.

TAVOLA 9

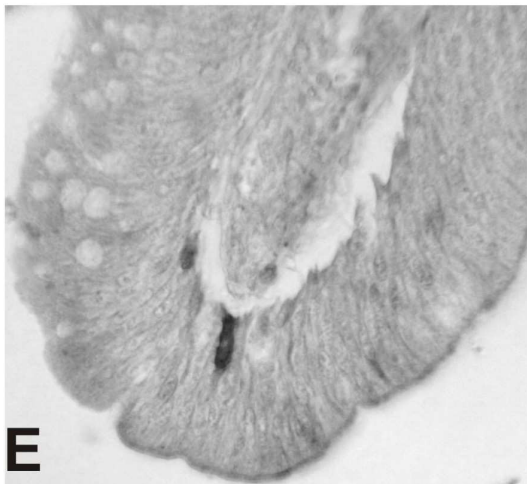
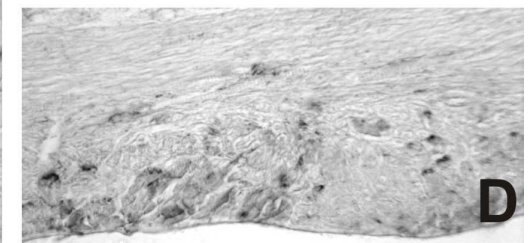
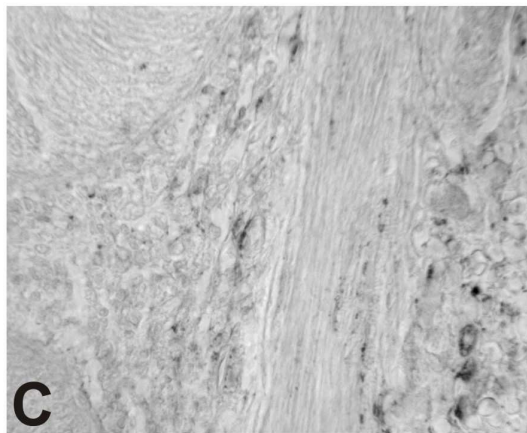
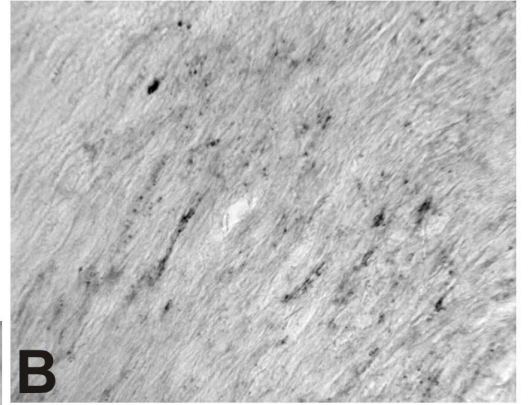


TAVOLA 9 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLA LEPTINA NELL'INTESTINO DI *DICENTRARCHUS LABRAX* E DI *CARASSIUS AURATUS*

Fig. A (x130). Fibre nervose intensamente reattive alla leptina nella tunica muscolare e nel plesso mienterico dell'intestino di *Dicentrarchus labrax*.

Fig. B (x300). Fibre nervose immunoreattive alla leptina nello strato circolare della tunica muscolare dell'intestino di *Dicentrarchus labrax*.

Fig. C (x300). Fibre nervose intensamente reattive alla leptina nelle tuniche sottomucosa e muscolare dell'intestino di *Carassius auratus*.

Fig. D (x200). Fibre nervose immunoreattive alla leptina nello strato longitudinale della tunica muscolare dell'intestino di *Carassius auratus*.

Fig. E (x220). Cellula immunoreattiva alla leptina, stretta ed allungata, nella porzione apicale dell'epitelio di rivestimento dei villi intestinali.

TAVOLA 10

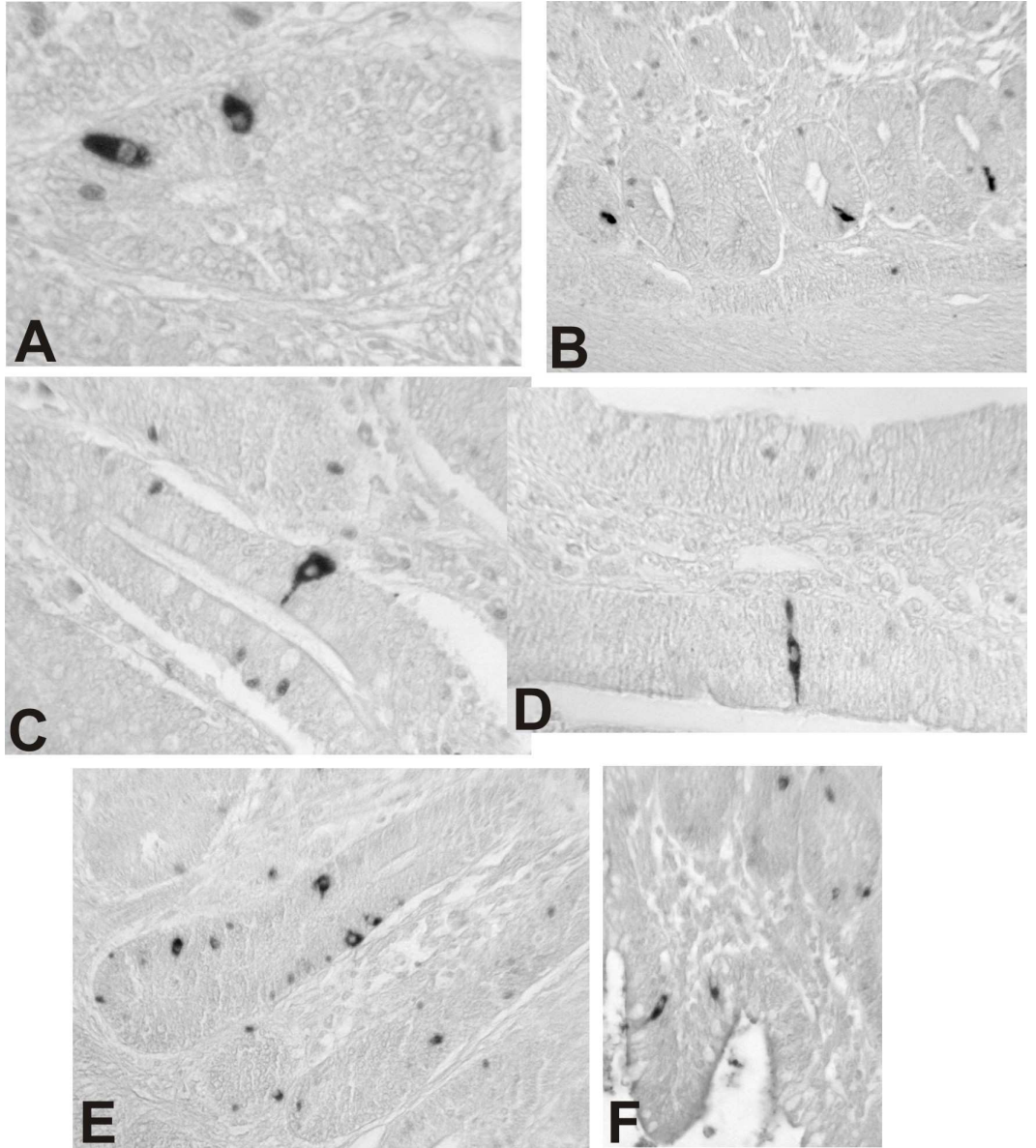


TAVOLA 10 (A-F). CELLULE IMMUNOREATTIVE AL GLP-1 NELL'INTESTINO DI *GALLUS DOMESTICUS*

Fig. A (x180). Cellule immunoreattive al GLP-1 nella porzione basale delle ghiandole tubulari dell'ileo superiore.

Fig. B (x80). Cellule immunoreattive al GLP-1, strette ed allungate, con un prolungamento a contatto con il lume nell'epitelio ghiandolare dell'ileo superiore.

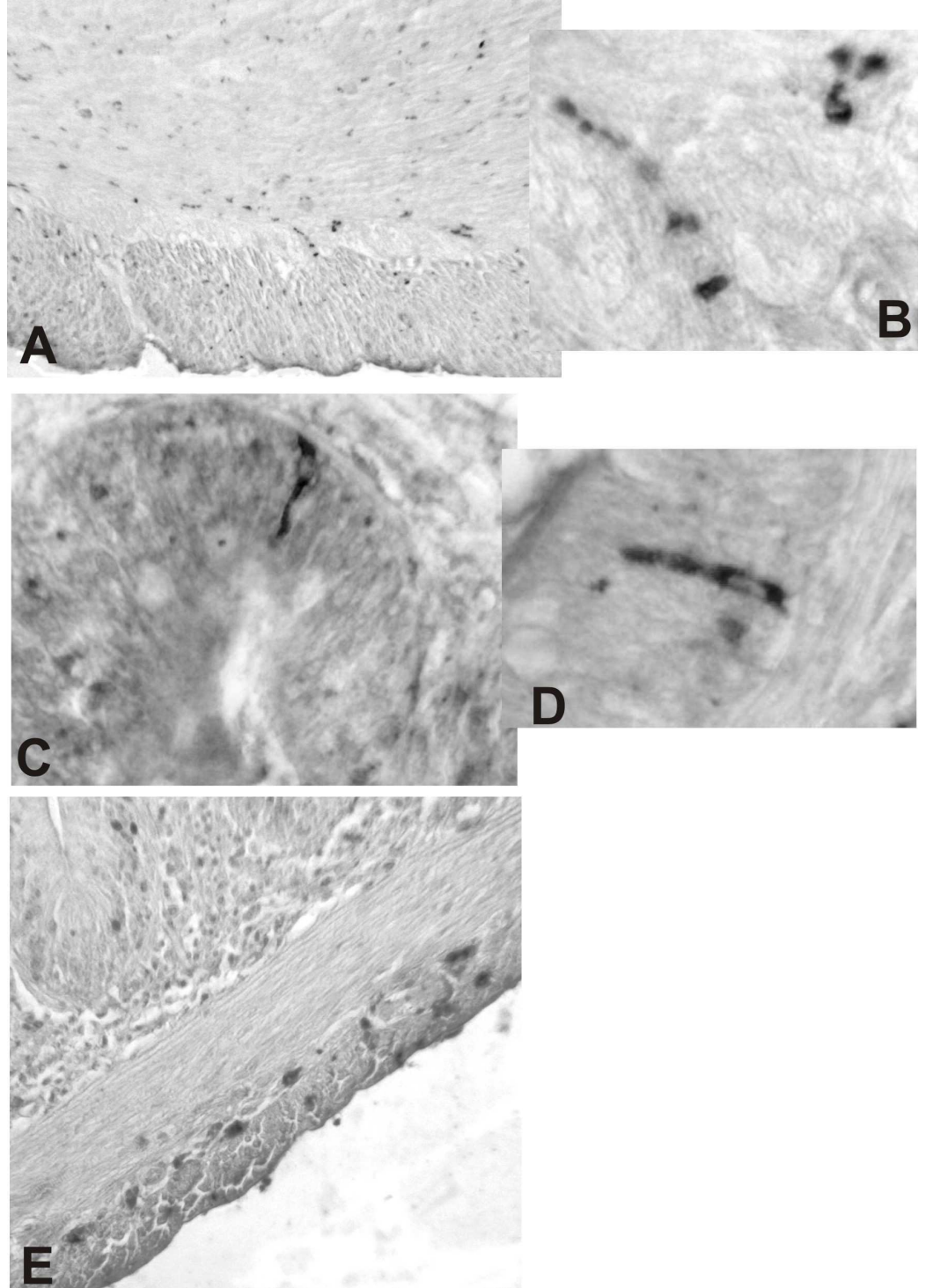
Fig. C (x160). Cellula immunoreattiva al GLP-1, di forma triangolare, allungata, con un prolungamento a contatto con il lume contenente piccoli granuli positivi nell'epitelio ghiandolare dell'ileo superiore.

Fig. D (x130). Cellula immunoreattiva al GLP-1, stretta, allungata, con un prolungamento apicale a contatto con il lume ed un prolungamento basale a contatto con la lamina basale, nell'epitelio mucoso dei villi dell'ileo superiore.

Fig. E (x80). Cellule immunoreattive al GLP-1, di forma allungata, con un prolungamento citoplasmatico che contatta il lume, nella porzione basale delle ghiandole tubulari dell'ileo inferiore.

Fig. F (x80). Cellule immunoreattive al GLP-1, di forma allungata, nell'epitelio mucoso dei villi dell'ileo inferiore

TAVOLA 11



**TAVOLA 11 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE AL
GLP-1 NELL'INTESTINO DI *DICENTRARCHUS LABRAX* E
DI *CARASSIUS AURATUS***

Fig. A (x120). Fibre nervose intensamente reattive al GLP-1 nella tunica muscolare e nel plesso mienterico dell'intestino medio di *Dicentrarchus labrax*.

Fig. B (x300). Fibre nervose immunoreattive al GLP-1 nel plesso mienterico dell'intestino medio di *Dicentrarchus labrax*.

Fig. C (x240). Cellula immunoreattiva al GLP-1, di forma allungata con un prolungamento citoplasmatico a contatto con il lume, nell'epitelio ghiandolare dell'intestino posteriore di *Dicentrarchus labrax*.

Fig. D (x300). Cellula immunoreattiva al GLP-1, di forma allungata con un prolungamento apicale rivolto verso il lume ed un prolungamento basale a contatto con la lamina basale nell'intestino posteriore di *Dicentrarchus labrax*.

Fig. E (x140). Fibre nervose immunoreattive al GLP-1 nel plesso mienterico dell'intestino medio di *Carassius auratus*.

TAVOLA 12

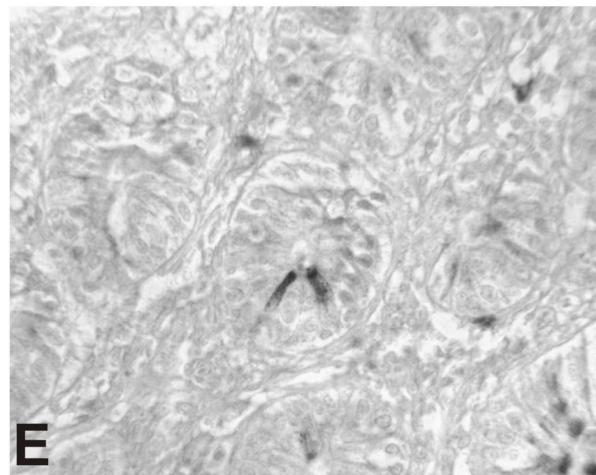
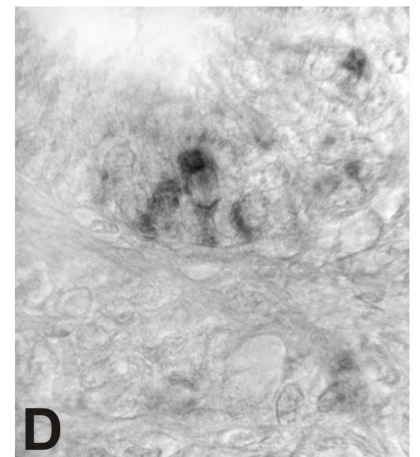
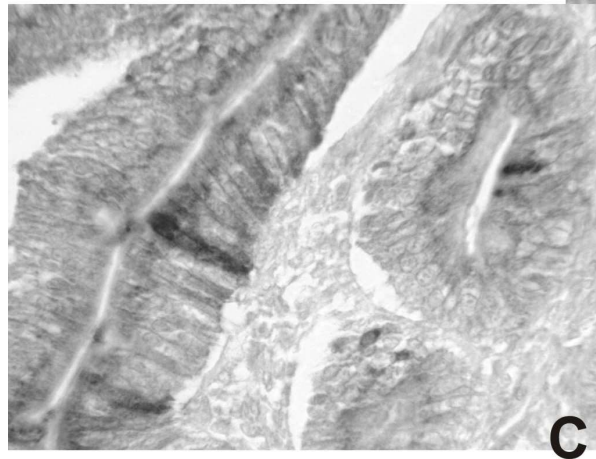
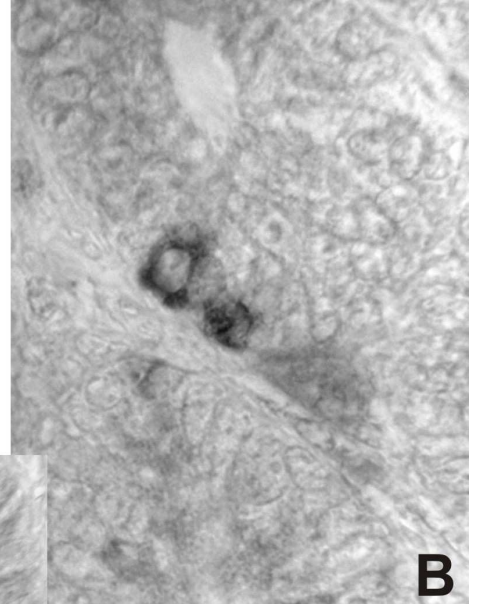
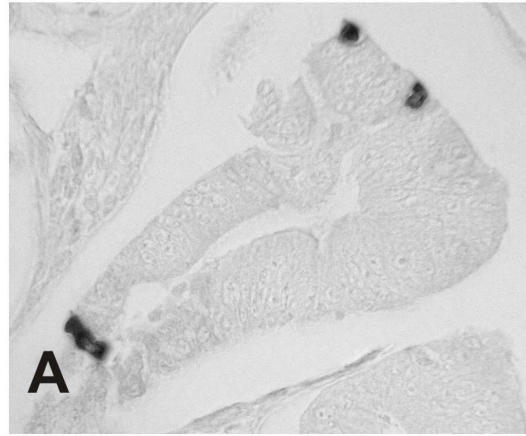


TAVOLA 12 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALLE OREXINE NEL TRATTO GASTROENTERICO DI *GALLUS DOMESTICUS*

Fig. A (x200). Cellule immunoreattive all'orexina-A, di forma tondeggianti ed allungate, nell'epitelio di rivestimento delle ghiandole tubulari composte del proventriglio.

Fig. B (x300). Cellule immunoreattive all'orexina-A, di forma tondeggianti, nella porzione profonda delle ghiandole tubulari del duodeno.

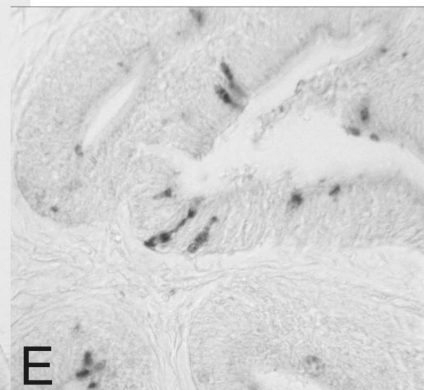
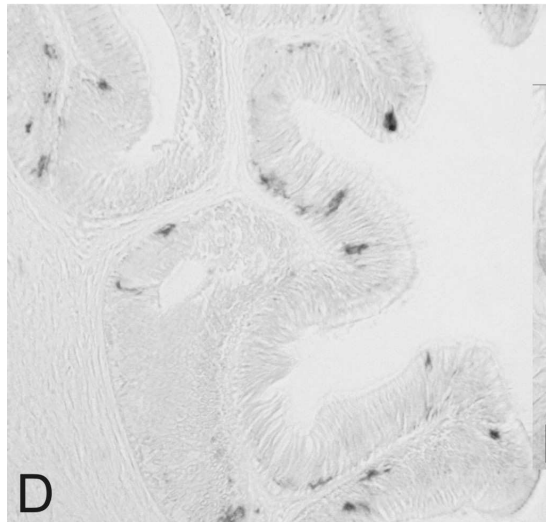
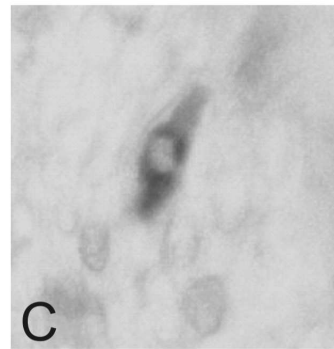
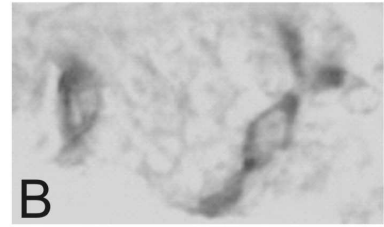
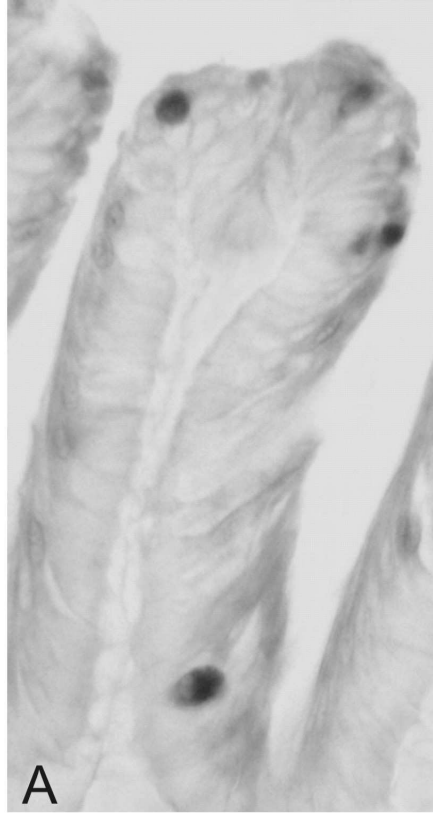
Fig. C (x240). Cellule immunoreattive all'orexina-A, di forma allungate, nell'epitelio di rivestimento dei ciechi.

Fig. D (x240). Cellule immunoreattive all'orexina-B, di forma tondeggianti ed allungate nella porzione profonda delle ghiandole tubulari dell'ileo.

Fig. E (x130). Cellule immunoreattive all'orexina-B, di forma allungate e con un prolungamento citoplasmatico a contatto con il lume, nell'epitelio ghiandolare dei ciechi.

Fig. F (x130). Cellula immunoreattiva all'orexina-B, stretta ed allungata nell'epitelio di rivestimento mucoso dei ciechi.

TAVOLA 13



**TAVOLA 13 (A-E). CELLULE IMMUNOREATTIVE
ALL'OREXINA-A NELLO STOMACO DI *DICENTRARCHUS
LABRAX***

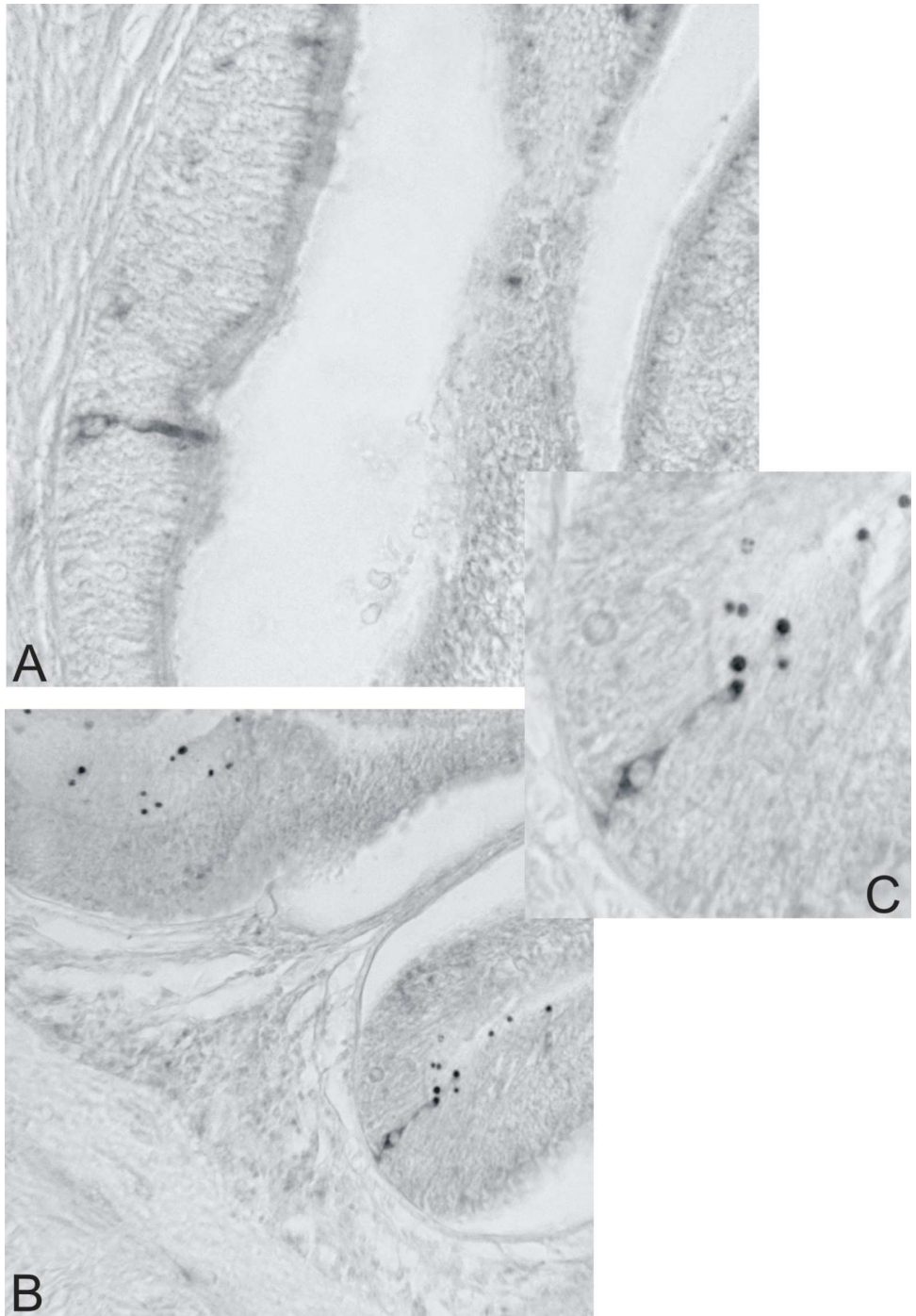
Fig. A (x300). Cellule immunoreattive all'orexina-A di forma tondeggiante nella porzione superiore e nel terzo medio delle pieghe mucose della regione cardiaca.

Fig. B (x350) e C (x350). Cellule immunoreattive all'orexina-A di forma grossolanamente ovalare ed allungata, con un processo a contatto con il lume nella regione cardiaca

Fig. D (x130). Cellule immunoreattive all'orexina-A nelle strutture ghiandolari della regione pilorica.

Fig. E (x130). Cellule immunoreattive all'orexina-A di forma allungata e sottile con un terminale slargato, intensamente reattivo, che contatta il lume.

TAVOLA 14



**TAVOLA 14 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE
ALL'OREXINA-A NELL'INTESTINO DI *DICENTRARCHUS
LABRAX***

Fig. A (x220). Cellule immunoreattive all'orexina-A nella porzione medio-basale dell'epitelio di rivestimento dei villi del segmento anteriore.

Fig. B (x240). Cellule immunoreattive all'orexina-A nella porzione basale dell'epitelio di rivestimento dei villi del segmento medio.

Fig. C (x130). Cellule immunoreattive all'orexina-A munite di un prolungamento apicale, a contatto con il lume, e di un prolungamento basale, a contatto con la lamina basale, fortemente reattivi.

TAVOLA 15

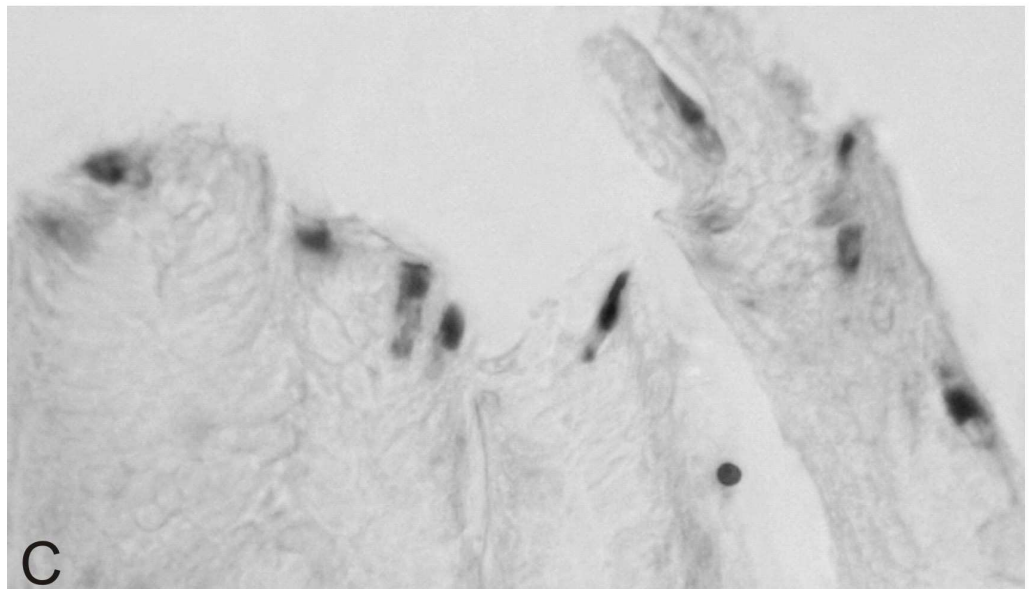
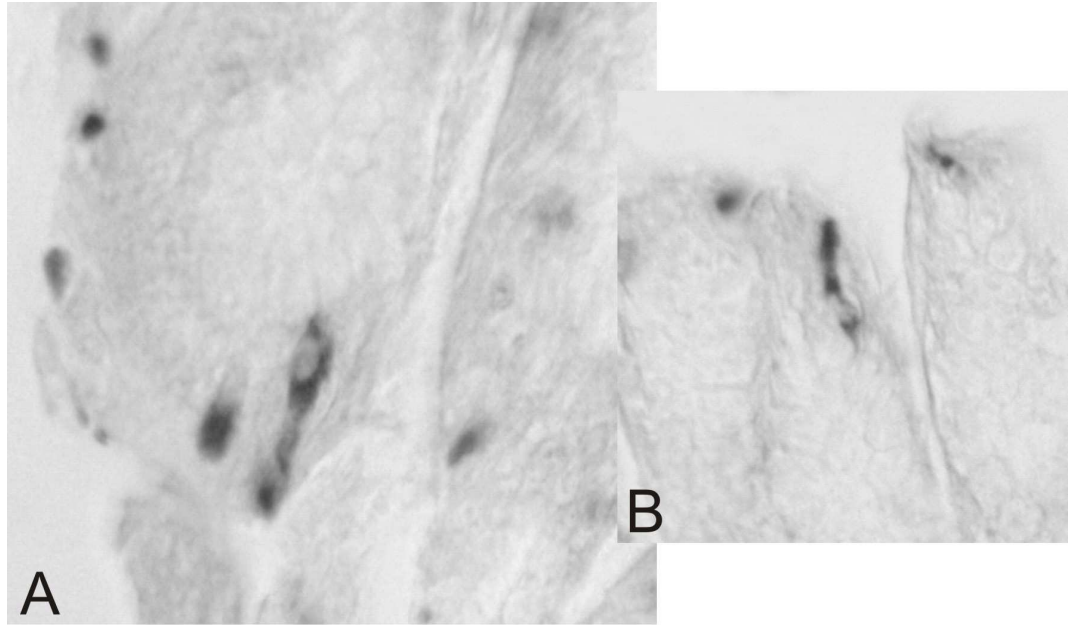


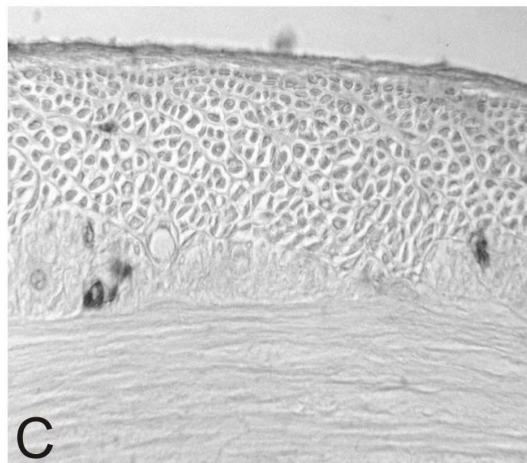
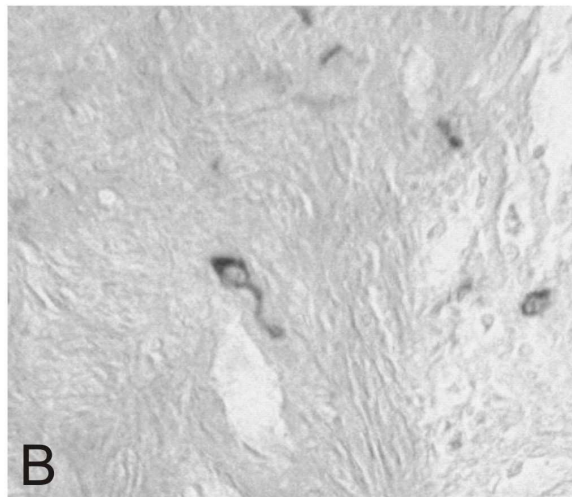
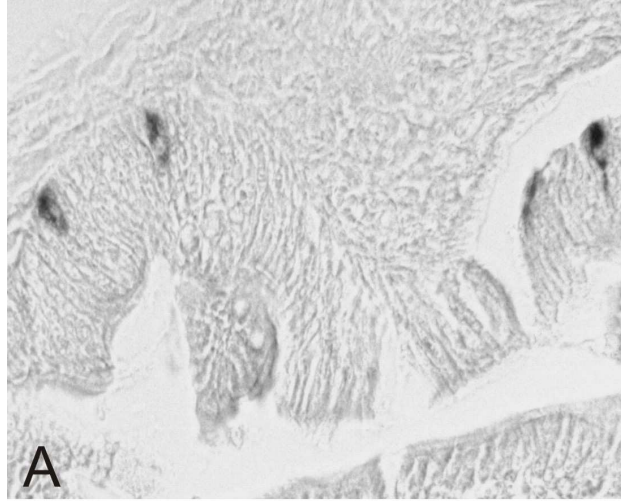
TAVOLA 15 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE ALL'OREXINA-B NELLO STOMACO DI *DICENTRARCHUS LABRAX*

Fig. A (x350). Cellule immunoreattive all'orexina-B lungo il margine e all'apice dell'epitelio di rivestimento delle pieghe mucose della regione cardiaca.

Fig. B (x200). Cellule immunoreattive all'orexina-B di forma tondeggianti ed allungate, con un prolungamento citoplasmatico fortemente reattivo a contatto con il lume nelle pieghe mucose della regione cardiaca.

Fig. C (x220). Cellule immunoreattive all'orexina-B lungo il margine delle pieghe mucose della regione pilorica.

TAVOLA 16



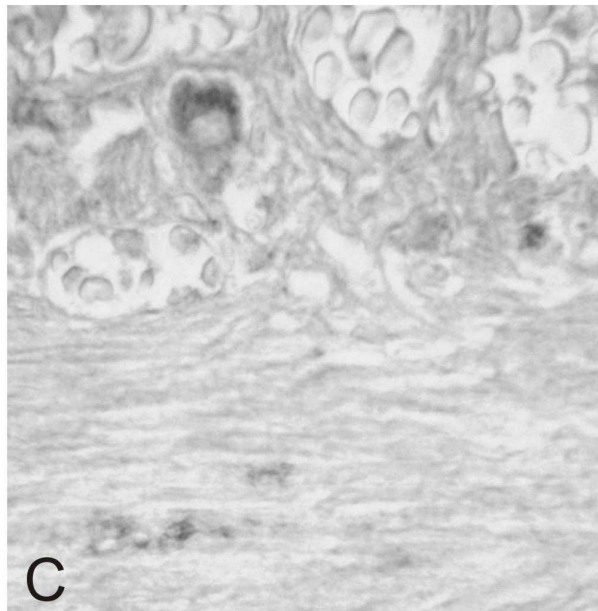
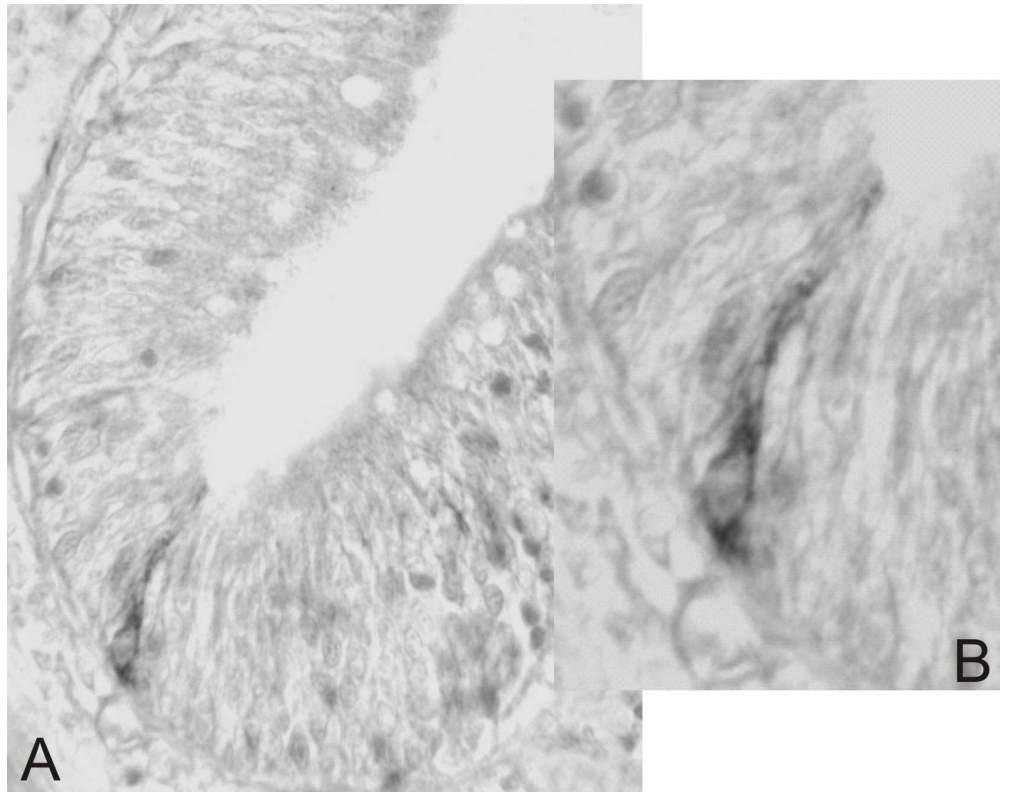
**TAVOLA 16 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE
ALL'OREXINA-B NELL'INTESTINO DI *DICENTRARCHUS*
*LABRAX***

Fig. A (x200). Cellule immunoreattive all'orexina-B nella porzione basale dell'epitelio di rivestimento dei villi dell'intestino anteriore.

Fig. B (x220). Neurone immunoreattivo all'orexina-B nella tunica sottomucosa dei segmenti intestinali distali.

Fig. C (x140). Neurone immunoreattivo all'orexina-B nel plesso mienterico dei segmenti intestinali distali.

TAVOLA 17



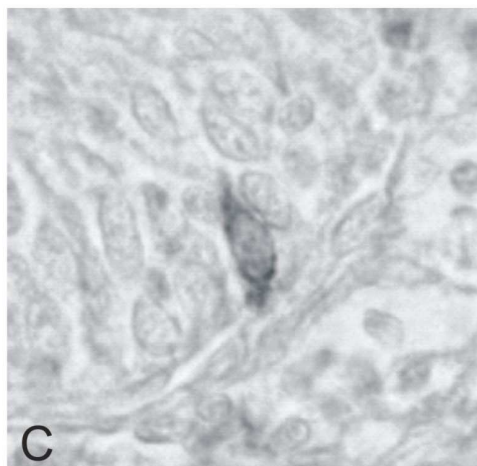
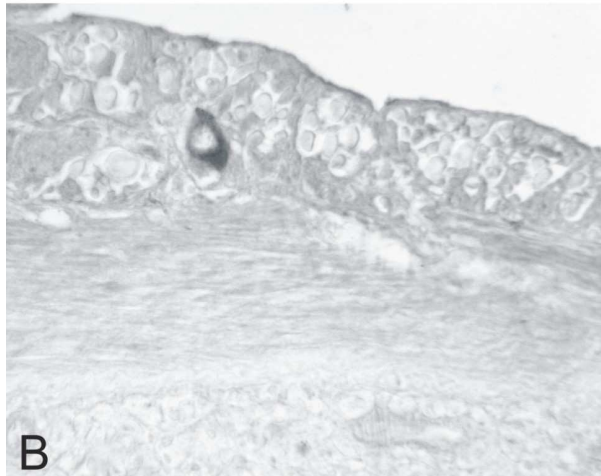
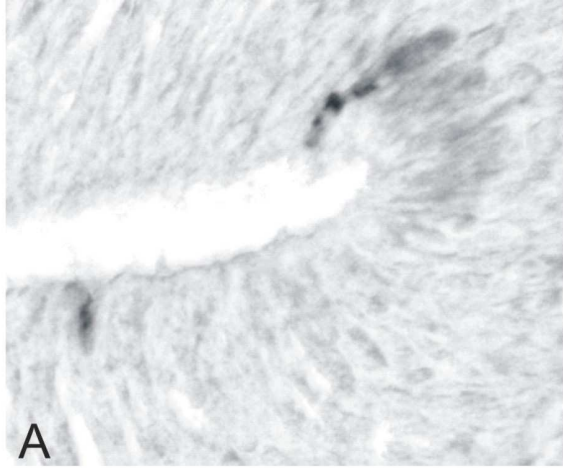
**TAVOLA 17 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE
ALL'OREXINA-A NELL'INTESTINO DI CARASSIUS
AURATUS**

Fig. A (x180). Cellule immunoreattive all'orexina-A nella porzione basale dell'epitelio di rivestimento dei villi dell'intestino anteriore.

Fig. B (x400). Cellula immunoreattiva all'orexina-A di forma allungata, con un prolungamento a contatto con il lume nei villi dell'intestino anteriore.

Fig. C (x300). Corpo neuronale e fibre nervose immunoreattive all'orexina-B nello strato circolare della muscolare e nel plesso mienterico dell'intestino.

TAVOLA 18



**TAVOLA 18 (A-C). CELLULE IMMUNOREATTIVE
ALL'OREXINA-B NELL'INTESTINO DI CARASSIUS
AURATUS**

Fig. A (x240). Cellule immunoreattive all'orexina-B di forma allungata, con un processo citoplasmatico a contatto con il lume, alla base dell'epitelio di rivestimento dei villi dell'intestino anteriore.

Fig. B (x220). Neurone immunoreattivo all'orexina-B nello strato longitudinale della tunica muscolare dell'intestino.

Fig. C (x280). Neurone immunoreattivo all'orexina-B nel plesso mienterico dell'intestino.

CAPITOLO 10.

DISCUSSIONE

Le attuali conoscenze sulla regolazione dell'appetito e dell'omeostasi energetica nei Vertebrati non-mammiferi sono decisamente limitate e si basano fundamentalmente su quanto riportato in letteratura per i Mammiferi. Infatti, anche per i differenti gruppi di Vertebrati non-mammiferi è stato descritto un centro superiore di controllo dell'assunzione di cibo comprendente specifici nuclei ipotalamici, e due principali sistemi periferici: un sistema a breve termine ed un sistema a lungo termine. Il primo coinvolge diversi peptidi regolatori sintetizzati nel tratto gastrointestinale, che oltre a modulare le attività locali (motilità e secrezione dell'apparato digerente) sarebbero in grado di inviare segnali di sazietà all'ipotalamo, determinando l'interruzione del pasto (es. colecistochinina, bombesina e GLP-1), il secondo coinvolge principalmente la leptina, un ormone proteico sintetizzato dagli adipociti e rilasciato in relazione allo stato dei depositi adiposi, che fornirebbe al SNC informazioni sulla disponibilità di energia metabolizzabile e sul bilancio energetico globale dell'organismo (per una review vedi Jensen J., 2001). Nella presente ricerca si è evidenziata una similitudine nel pattern di distribuzione immunostochimica dei peptidi coinvolti nei due sistemi nelle due

classi di Vertebrati non-mammiferi studiate. I risultati di tali localizzazioni, inoltre, oltre a fornire i primi dati completi di una presenza di tali peptidi nell'apparato gastroenterico di Uccelli e Pesci Teleostei, hanno evidenziato una discreta conformità con quelle descritte in letteratura per i Mammiferi. Si procede, quindi, a discutere analiticamente tali risultati per ogni singolo peptide.

10.1. GRELINA

Per tale ricerca è stato utilizzato un anticorpo policlonale, ottenuto in coniglio e diretto contro la regione C-terminale della grelina di ratto. Poiché la grelina di pollo possiede circa il 54% di sequenza nucleotidica identica a quella di ratto e uomo (Kaiya et al., 2002), questo anticorpo sicuramente cross-reagisce con la grelina di pollo.

La presenza di cellule immunoreattive alla grelina nello strato mucoso dei diversi segmenti del tratto digestivo di pollo contraddice quanto riportato in un recente lavoro da Ahmed ed Harvey (2002) che hanno riscontrato immunoreattività alla grelina solamente in alcune aree ipotalamiche ma non nel proventricolo, nello stomaco muscolare, nell'ileo e nel colon. Probabilmente la difformità di risultati ottenuta nei due studi è da attribuire all'utilizzo di anticorpi diversi. Infatti, entrambi gli anticorpi interagiscono con la regione C-terminale della grelina di ratto, ma mentre quello impiegato nella presente ricerca

risulta essere specifico per metodiche di immunistochemica, quello utilizzato da Ahmed e Harvey è indicato per la *radioimmunoassay* (RIA). In ogni caso, la presenza di grelina nel cervello e nel tratto gastrointestinale di pollo fa supporre che essa possa agire sia da neuropeptide che da ormone gastrointestinale.

Il maggior numero di cellule immunoreattive alla grelina è stato osservato principalmente nel proventriglio, corrispondente al fondo dello stomaco nei Mammiferi, e nel duodeno. Procedendo verso i segmenti più distali dell'intestino questa immunoreattività è andata progressivamente scemando sia in termini numerici che di intensità. Tali risultati possono essere perfettamente sovrapponibili a quanto riportato precedentemente in alcuni studi eseguiti sul tratto digestivo di ratto e di uomo. Infatti, Kojima et al. (1999) and Date et al. (2000) hanno riscontrato immunoreattività alla grelina principalmente a livello della mucosa ossintica del fondo gastrico, e, anche in questo caso, il numero di cellule immunoreattive tende a ridursi man mano che ci si sposta dal piccolo verso il grosso intestino. Perciò è verosimile che, come nel ratto e nell'uomo, anche nel pollo la grelina possa influenzare diverse funzioni gastrointestinali, quali la motilità e la secrezione acida dello stomaco, ed agire sulla ghiandola pituitaria anteriore attraverso il circolo sistemico, partecipando alla regolazione della secrezione dell'ormone della crescita ed all'assunzione di cibo. Proprio in virtù del pattern di distribuzione e delle caratteristiche

morfologiche delle cellule immunoreattive alla grelina nel pollo, è probabile che esse corrispondano allo stesso tipo cellulare endocrino dei Mammiferi. Infatti, Kojima et al. (1999) and Date et al. (2000) hanno anche caratterizzato le cellule sintetizzanti grelina nel tratto gastroenterico di ratto e di uomo attraverso studi ultrastrutturali e metodiche di immunoistochimica. Sia la localizzazione che le caratteristiche ultrastrutturali delle cellule immunoreattive alla grelina, hanno indicato che esse corrispondono alle “X/A-like cells”, popolazione cellulare particolarmente rappresentata nella mucosa ossintica di entrambe le specie (circa il 20%), ma il cui ruolo fisiologico è tutt’oggi ancora da accertare. Comunque, per quanto riguarda il pollo, sono necessarie ulteriori indagini per identificare con certezza il tipo cellulare specifico secondo la corrente classificazione (Solcia et al., 2000), sebbene le popolazioni e la distribuzione delle cellule endocrine nei visceri dei volatili siano del tutto sovrapponibili con la situazione descritta nei Mammiferi (Rawdon and Andrew, 1999).

Bisogna inoltre considerare che le cellule immunoreattive alla grelina nel tratto gastroenterico di pollo si sono presentate di due tipi, aperte e chiuse, proprio come è stato descritto in precedenza nel tratto gastrointestinale di ratto (Sakata et al., 2002). Il tipo cellulare aperto, di forma allungata e con un processo citoplasmatico in contatto con il lume ghiandolare è, da un punto di vista funzionale,

influenzato da informazioni lumenali quali il contenuto nutrizionale degli alimenti ed il pH. Le cellule di tipo chiuso, per lo più di forma rotondeggiante e prive di ogni contatto con il lume ghiandolare, sono funzionalmente modulate da ormoni, fattori locali, stimolazioni nervose e distensioni meccaniche (Lewin KJ, 1986; Solcia et al., 2000). Il numero di cellule di tipo aperto è andato gradualmente riducendosi, spostandosi dallo stomaco ghiandolare verso le porzioni più distali dell'intestino; le cellule di tipo chiuso sono risultate la popolazione cellulare più rappresentata nei vari segmenti del tratto gastroenterico di pollo. Quindi, la presenza di entrambi i tipi cellulari e la loro diversa distribuzione nelle varie regioni del tratto gastroenterico di pollo, fa supporre non solo che la secrezione di grelina in questo distretto sia regolata da molteplici e differenti fattori, ma che ogni segmento svolga un ben preciso e distinto ruolo funzionale.

Anche nel *Dicentrarchus labrax* il maggior numero di cellule immunoreattive alla grelina è stato osservato nel comparto gastrico, soprattutto in corrispondenza del sacco cieco con un significativo incremento di densità in direzione della regione pilorica. Procedendo dall'intestino anteriore verso i segmenti più distali, questa immunoreattività è andata decisamente scemando in termini numerici. Allo stesso modo, nel *Carassius auratus*, teleosteo privo di un vero e proprio comparto gastrico, le cellule immunoreattive alla

grelina sono state rinvenute in maggior numero in corrispondenza dell' intestino anteriore che dà luogo al bulbo intestinale, considerato, almeno da un punto di vista morfologico, un analogo dello stomaco. Tali risultati sono in perfetto accordo con quanto descritto in precedenza per i Mammiferi (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000), con i risultati ottenuti sul pollo nel presente lavoro ed in parte con un recentissimo studio di Sakata et al., volto alla identificazione di cellule sintetizzanti grelina nello stomaco di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakata et al., 2004). Anche in questa specie il maggior numero di cellule immunoreattive alla grelina è stato rinvenuto in corrispondenza del cieco gastrico con un graduale incremento verso la porzione pilorica. La differente densità di cellule positive in queste due regioni gastriche, riscontrata nella spigola e nella trota iridea, potrebbe essere legata alle caratteristiche qualitative delle razioni alimentari. Infatti, sebbene i serranidi al pari dei salmonidi siano pesci carnivori, i carboidrati sono ampiamente utilizzati nella formulazione delle razioni alimentari destinate agli esemplari in allevamento intensivo, in quanto considerati una importante fonte di energia a buon mercato. Dal momento che la digestione e l'assorbimento dei glucidi avvengono principalmente in corrispondenza della regione pilorica, è probabile che l'elevato contenuto di grelina in tale sede, sia da ricondurre alla capacità di questo peptide di influenzare, come nei Mammiferi, la secrezione

acida e la motilità gastrica in vista dei fenomeni digestivi (Masuda et al., 2000).

Oltre al pattern di distribuzione, anche le caratteristiche morfologiche delle cellule sintetizzanti grelina nella spigola sono del tutto sovrapponibili a quanto riportato in precedenza nello stomaco di ratto, di pollo e di trota (Sakata et al., 2002; Wada et al., 2003; Sakata et al., 2004). La presenza di entrambi i tipi cellulari (aperto e chiuso) fa supporre che anche nei Pesci la secrezione di grelina sia regolata da molteplici fattori e che possa avere effetti fisiologici ben precisi e del tutto paragonabili a quelli descritti per gli Uccelli ed i Mammiferi. Tuttavia, per poter identificare il tipo cellulare sintetizzante grelina nei Pesci sono necessarie ulteriori indagini di tipo ultrastrutturale.

Bisogna inoltre considerare che, a differenza di quanto riportato negli Uccelli, sia nel *Dicentrarchus labrax* che nel *Carassius auratus* è stato osservato un certo grado di immunoreattività dei corpi neuronali e delle fibre nervose del plesso mienterico e della tunica muscolare. Tale situazione fa supporre, proprio come è stato descritto per i Mammiferi, l'intervento oltre che del complesso vagale anche del sistema nervoso enterico nella mediazione degli effetti della grelina sulla motilità del tratto gastrointestinale nei Pesci Teleostei (Masuda et al., 2000; Peeters T.L., 2003).

Fino ad oggi, la presenza e la struttura del peptide grelina è stata indagata in diverse classi di Vertebrati non-mammiferi, quali Uccelli (Kaiya et al., 2002), Anfibi (Kaiya et al., 2001; Galas et al., 2002), e Pesci (Uniappan et al., 2002; Kaiya et al., 2003a; 2003b; 2003c; Parhar et al., 2003). Lo studio filogenetico della sequenza aminoacidica della grelina ha mostrato un alto grado di conservazione del “core attivo” (GSSF) di tale peptide nell'*Oreochromis niloticus* (Parhar et al., 2003), nell'*Oreochromis mossambicus* (Kaiya et al., 2003b), nell'*Oncorhynchus mykiss* (Kaiya et al., 2003c), nell'*Anguilla japonica* (Kaiya et al., 2003a), e nel *Gallus gallus* (Kaiya et al., 2002), mentre nella *Rana catesbeiana* (GLTF) (Kaiya et al., 2001) e nel *Carassius auratus* (GTSF) (Uniappan et al., 2002), il secondo amino acido serina è sostituito dalla treonina. Questa modificazione, però, non sembra avere ripercussioni sugli effetti biologici della grelina di *Carassius auratus*, in quanto sia la serina che la treonina mostrano similitudini funzionali. Inoltre, in tutte le specie di Pesci Teleostei in cui è stata caratterizzata la struttura del peptide grelina, è stata osservata una caratteristica amidazione in corrispondenza del terminale carbossilico, non rinvenuta nei Mammiferi, negli Uccelli e negli Anfibi (Kojima et al., 1999; Uniappan et al., 2002; Kaiya et al., 2003a; 2003b; 2003c). Dal momento che la grelina di *Anguilla japonica* è in grado di stimolare in vivo nei ratti il rilascio di GH con una potenza ed una intensità del tutto

sovrapponibili alla grelina di ratto (Kaiya et al., 2003a), è verosimile che la struttura amidata non abbia effetti sul legame e sull'attività del GHS-R nei roditori e, probabilmente, sulle altre specie. I primi quattro aminoacidi risultano altamente conservati anche nell'uomo e nel ratto (Kojima et al., 1999). Infatti, al pari della grelina dei Mammiferi, la grelina dei Vertebrati non-mammiferi è in grado di stimolare l'appetito ed il rilascio di ormoni dalla adenoipofisi. Risulta perciò che il peptide grelina è, da un punto di vista filogenetico, altamente conservato dai Pesci fino ai Mammiferi.

Recentemente, Galas et al. (2002) hanno studiato la distribuzione della grelina nel cervello e nello stomaco di un'altra specie anfibia: la *Rana esculenta*. In particolare, hanno riscontrato la presenza di cellule immunoreattive alla grelina in entrambi i distretti oggetto dello studio, ma le positività più numerose sono state principalmente osservate nella mucosa gastrica e nelle ghiandole associate. Quindi, anche in questo caso, la localizzazione della grelina corrisponde perfettamente a quanto descritto nello stomaco di uomo e ratto e delle specie non-mammifere oggetto della presente ricerca, evidenziando anche morfologicamente un alto grado di conservazione.

10.2. LEPTINA

Tra i Vertebrati non-mammiferi la leptina è stata sequenziata per la prima volta nel pollo (*Gallus domesticus*) da Taouis et al. (1998), mostrando un'elevata omologia con il peptide isolato nell'uomo e nel ratto e facendo così presupporre di essere responsabile di effetti biologici del tutto sovrapponibili a quelli descritti nei Mammiferi. I principali siti di produzione evidenziati sono stati il tessuto adiposo bianco e, a differenza di quanto osservato nei Mammiferi, il fegato (Taouis et al., 1998; Ashwell et al., 1999; Richards et al., 2000). L'espressione epatica del peptide è stata associata al ruolo primario che questo organo riveste nella lipogenesi delle specie aviarie (Taouis et al., 1998). Inoltre, recentemente, l'espressione del peptide leptina è stata indagata anche in diverse specie di pesci da Johnson et al. (2000) che ne hanno verificato la presenza in sangue, cuore, fegato e cervello. Considerando che il principale sito di produzione della leptina è il fegato nel pollo ed il cervello nei Pesci, non è da escludere in questi Vertebrati non-mammiferi l'esistenza di siti alternativi di sintesi del peptide in questione. I risultati di questo studio supportano proprio l'ipotesi che il tratto gastroenterico possa rappresentare una nuova fonte di leptina nelle specie prese in esame.

La individuazione di cellule immunoreattive alla leptina nel proventriglio e nell'intestino (tenue e crasso) costituisce la prima

dimostrazione della presenza di tale peptide nell'intero tratto gastroenterico di Uccelli. Fino ad oggi, infatti, gli studi immunohistochimici volti alla localizzazione del peptide leptina nell'apparato digerente, hanno riguardato esclusivamente lo stomaco di ratto (Bado et al., 1998) e di uomo (Cinti et al., 2000; 2001) tra i Mammiferi, di trota iridea, di rana e di lucertola, tra i Vertebrati non-mammiferi (Muruzabal et al., 2002). Le cellule immunoreattive alla leptina nel proventriglio di pollo sono state localizzate sia lungo la porzione medio-bassa dell'epitelio di rivestimento mucoso che nell'epitelio delle ghiandole tubulari composte. L'immunoreattività ha interessato due differenti tipi cellulari: cellule secernenti colonnari basse, identificate sulla base delle localizzazione e delle caratteristiche morfologiche come cellule ossintopeptiche, e cellule epiteliali tipicamente endocrine, definite tali per la forma allungata e la presenza di un processo citoplasmatico a contatto con il lume dell'organo. Tali risultati concordano perfettamente con quanto descritto precedentemente per i Mammiferi (Bado et al., 1998; Cinti et al., 2000; Sobhani et al., 2000; Cinti et al., 2001), i Rettili e gli Anfibi (Muruzabal et al., 2002). In entrambe le classi di Vertebrati, infatti, l'immunoreattività alla leptina è stata maggiormente osservata in cellule principali secernenti pepsinogeno (Bado et al., 1998; Sobhani et al., 2000), corrispondenti alle caratteristiche cellule ossintopeptiche dei Vertebrati non-mammiferi (Vial and Garrido, 1979), ed in

cellule tipicamente endocrine della porzione medio-bassa della mucosa del fondo gastrico (Cinti et al., 2000). La presenza di leptina nel proventriglio di pollo e la sintesi nei suddetti tipi cellulari fa presupporre un coinvolgimento di tale peptide nella regolazione di alcune attività locali (mantenimento dell'integrità dell'epitelio della mucosa) e nel controllo a breve termine dell'assunzione di cibo negli Uccelli, proprio come è stato descritto per i Mammiferi (Picó et al., 2003; Guilmeau et al., 2004). E' verosimile, infatti, che la leptina, rilasciata nel lume proventricolare in seguito all'ingestione di cibo, possa agire a livello centrale e indurre la caratteristica sazietà post-prandiale, influenzando principalmente frequenza e dimensione dei pasti, secondo un duplice meccanismo d'azione. Attraverso il circolo generale, grazie ad un sistema di trasporto mediato, penetrerebbe nel SNC e, mediante l'interazione con il recettore Ob-Rb localizzato nell'ipotalamo mediale, sarebbe in grado di influenzare i due principali sistemi peptidergici coinvolti nella regolazione del comportamento alimentare: NPY/AgRP e α -MSH (Schwartz et al., 1999). In alternativa, non è da escludere un'azione sinergica con altri peptidi gastrointestinali correlati al pasto ed inducenti sazietà (CCK) attraverso la stimolazione di afferenze vagali, come è stato già riportato nei Mammiferi (Lewin and Bado, 2001). Inoltre, ricorrendo a studi di microscopia elettronica Cinti et al. (2001) hanno anche identificato nelle "cellule P" dell'uomo le cellule endocrine

sintetizzanti leptina. Negli Uccelli però, tenendo conto della classificazione corrente (Solcia et al., 2000), sono necessarie ulteriori indagini ultrastrutturali per poter identificare il citotipo secernente il peptide leptina.

Immunoreattività alla leptina è stata osservata anche lungo l'intero segmento intestinale di pollo, sebbene il maggior numero di cellule positive sia stato rinvenuto nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo. Tale risultato costituisce la prima dimostrazione della presenza di tale peptide nell'intestino animale. Infatti, fino ad oggi, è stata documentata l'esistenza soltanto del recettore per la leptina Ob-R nel tratto digerente di uomo, topo, ratto e pollo (Morton et al., 1998; Ohkubo et al., 2000; Sobhani et al., 2000; Barrenetxe et al., 2002; Cammisotto et al., 2005). La presenza della leptina e del suo recettore nell'epitelio di rivestimento dei villi intestinali di pollo suggerisce un possibile coinvolgimento di tale peptide nella modulazione di alcune attività locali: motilità della parete del viscere, protezione dell'integrità dell'epitelio, regolazione dei processi infiammatori, assorbimento dei principi nutritivi. In particolare, essendone stato trovato il maggior numero nei segmenti intestinali deputati proprio a questa funzione, la leptina potrebbe bilanciare l'assorbimento di proteine e grassi della dieta, evitando così un eccessivo deposito di adipe.

Nella spigola l'immunoreattività alla leptina ha interessato elementi cellulari, corpi neuronali e fibre nervose dell'intero tratto

gastroenterico. In particolare, numerose cellule immunopositive, destinate a scemare di densità ed intensità verso la regione pilorica, sono state osservate nell'epitelio delle ghiandole gastriche della regione cardiaca. Meno numerose, ma con un sovrapponibile pattern distributivo nelle tre regioni dello stomaco, sono state le cellule endocrine positive delle pliche mucose. Tale risultato concorda in parte sia con quanto riportato precedentemente da Muruzabal et al. (2002) che da Bosi et al. (2004). Infatti, mentre Muruzabal et al. hanno osservato immunoreattività alla leptina soltanto in poche cellule di tipo endocrino dell'epitelio mucoso, Bosi et al. hanno localizzato le cellule positive alla leptina nell'epitelio delle ghiandole gastriche. Inoltre, i risultati ottenuti nella spigola sono perfettamente sovrapponibili a quelli ottenuti in questo studio nel proventriglio di pollo e a quelli precedentemente citati e discussi per i Mammiferi (Bado et al., 1998; Cinti et al., 2000; Sobhani et al., 2000; Cinti et al., 2001;). Oltre alle cellule epiteliali, nel comparto gastrico l'immunoreattività ha interessato fibre nervose ricorrenti nelle tuniche muscolare e sottomucosa. In particolare, il maggior numero di fibre positive è stato osservato nello strato circolare della muscolare della regione cardiaca, esattamente nel punto di transizione tra fibre striate (proprie della muscolatura esofagea) e fibre lisce (tipiche della muscolatura gastrica). Tale situazione concorda perfettamente con quanto descritto da Bosi et al. (2004) per la trota iridea. Quindi,

anche per la spigola, si deve supporre una correlazione tra innervazione leptinica delle fibre muscolari striate e regolazione del metabolismo degli acidi grassi come descritto recentemente per i Mammiferi (Bjorbaek and Kahn, 2004; Steinberg et al., 2004).

Nei segmenti intestinali l'immunoreattività alla leptina ha interessato numerose fibre nervose e qualche corpo neuronale degli strati circolare e longitudinale della tunica muscolare, nonché del plesso mienterico. Una così estesa ed intensa innervazione suggerisce un coinvolgimento del peptide leptina nella regolazione della attività motoria del viscere e dell'assorbimento dei principi nutritivi, come descritto precedentemente per gli Uccelli ed i Mammiferi (Guilmeau et al., 2004).

Nel *Carassius auratus* l'immunoreattività alla leptina ha interessato una estesa componente nervosa e pochi elementi cellulari dell'epitelio mucoso. Nell'intero segmento intestinale fibre intensamente reattive alla leptina sono state osservate nelle tuniche sottomucosa e muscolare, sebbene le più numerose siano state quelle ricorrenti nello strato longitudinale della muscolare. Tale localizzazione fa presupporre, anche in questa specie, un intervento della leptina nel controllo, attraverso le afferenze vagali, di alcune azioni fisiologiche locali (motilità e secrezione del viscere). Inoltre, sono risultate positive, seppure in numero esiguo, cellule dell'epitelio mucoso dei segmenti intestinali anteriore e medio. Tali cellule,

maggiormente addensate in corrispondenza della sommità dei villi, hanno mostrato la tipica morfologia delle cellule endocrine. Quindi, la presenza di immunoreattività in questi distretti, corrispondenti allo stomaco ed all'intestino tenue dei Mammiferi, ed il coinvolgimento del suddetto tipo cellulare, sovrapponibile per caratteristiche morfologiche e pattern distributivo ad uno dei due tipi cellulari sintetizzanti leptina nei Mammiferi, fa supporre, che, come nei Mammiferi, anche in questo vertebrato non-mammifero, il peptide leptina sia in grado di influenzare diverse attività gastrointestinali ed il controllo centrale dell'assunzione di cibo. A questo proposito, Volkoff et al. (2003) hanno recentemente dimostrato che nel *Carassius auratus* iniezioni sia centrali (intracerebroventricolari) che periferiche (intraperitoneali) di leptina murina sono in grado di ridurre l'assunzione di cibo. Per ottenere tale effetto, però, sono richieste dosi periferiche di leptina più elevate rispetto a quelle somministrate centralmente, suggerendo che nei Pesci al pari dei Mammiferi, tale peptide agisca principalmente regolando l'espressione e l'attività di alcuni peptidi ipotalamici per il mantenimento dell'omeostasi energetica (Ahima et al., 2000; Williams et al., 2001). A livello centrale, la leptina potenzierebbe l'azione anoressizzante del CART e del CCK ed inibirebbe il consumo di cibo indotto da NPY e Orexina-A, come dimostrato dalla aumentata espressione di CART e di CCK, associata ad una ridotta espressione

di NPY nel cervello di *Carassius auratus* (Volkoff and Peter, 2001a; Volkoff et al., 2003). Dato il coinvolgimento di una abbondante componente nervosa e la presenza di cellule secernenti leptina, non è da escludere una eventuale interazione della leptina di derivazione intestinale con i suddetti circuiti neuronali attraverso la stimolazione di afferenze vagali. Quindi è verosimile che, nei Pesci come nei Mammiferi, la leptina partecipi attivamente alla regolazione del bilancio energetico ed al mantenimento del peso corporeo.

10.3. OREXINE

La prepro-orexina è stata clonata, sequenziata e caratterizzata non solo in differenti specie di mammiferi (Sakurai et al., 1998; Dyer C.J. et al., 1999), ma anche in alcuni Vertebrati non-mammiferi (Shibahara et al., 1999; Galas et al., 2001; Alvarez and Sutcliffe, 2002; Ohkubo et al., 2002; Kaslin et al., 2004), mostrando una notevole omologia tra le classi di Vertebrati. Ne consegue che anche la struttura dei peptidi derivanti dalla suddetta molecola e verosimilmente gli effetti biologici mostrano un alto grado di conservazione nella scala evolutiva.

Data l'espressione delle orexine nell'ipotalamo dei Mammiferi e dei Vertebrati non-mammiferi e la recente individuazione di orexina-A e orexina-B nell'apparato digerente di uomo e di roditori

(Kirchgessner and Liu, 1999; Kirchgessner A.L., 2002; Nakabayashi et al., 2003), non è da escludere che tali peptidi siano presenti anche nel tratto gastroenterico di Uccelli e Pesci, esercitando un controllo locale diretto sulle funzioni del viscere ed un controllo mediato da vie nervose sulla regolazione dell'assunzione di cibo.

La presenza di immunoreattività ad entrambe le orexine nel tratto gastroenterico di *Gallus domesticus* costituisce la prima prova della esistenza di questi peptidi in alcuni tessuti periferici e non solo nell'ipotalamo di pollo (Ohkubo et al., 2002). In particolare, nel proventriglio numerose cellule intensamente reattive all'orexina-A sono state osservate nella porzione profonda dell'epitelio di rivestimento delle ghiandole tubulari composte e, in virtù della distribuzione e delle caratteristiche morfologiche, queste cellule sono state considerate tipicamente endocrine. Tale situazione è in perfetto accordo con quanto riportato in alcuni lavori precedenti condotti sul tratto digerente dei Mammiferi (Kirchgessner and Liu, 1999; Kirchgessner A.L., 2002; Nakabayashi et al., 2003). Infatti, sia nell'uomo che nei roditori l'immunoreattività all'orexina-A è stata riscontrata in cellule endocrine della mucosa gastrica, con una maggiore densità in corrispondenza dell'antrum pilorico. La corrispondenza tra distribuzione e tipi cellulari coinvolti nelle due classi di Vertebrati fa supporre che, come nei Mammiferi anche negli Uccelli, il peptide orexina-A possa modulare alcune attività locali, con

particolare riferimento alla secrezione acida ed allo svuotamento gastrico. Di conseguenza, per gli effetti biologici di cui sarebbe responsabile, il peptide orexina-A entrerebbe a far parte di quel gruppo di molecole segnali capaci di influenzare sia i processi post-ingestivi del sistema periferico della sazietà sia, presumibilmente attraverso la stimolazione delle afferenze vagali, i centri superiori che presiedono al controllo dell'assunzione di cibo. Immunoreattività all'orexina-A, inoltre, è stata osservata nella porzione profonda dell'epitelio ghiandolare e nell'epitelio mucoso, per lo più alla base dei villi di tutto il piccolo intestino, sebbene il numero di cellule positive sia andato scemando progredendo dal duodeno verso l'ileo. Le cellule sintetizzanti orexina-A nell'intestino tenue di pollo, sulla base della localizzazione, delle caratteristiche morfologiche e della presenza di immunoreattività alla 5-HT (dati personali), sono state identificate in uno specifico tipo cellulare endocrino, le "cellule enterocromaffini". Tale risultato è perfettamente sovrapponibile a quanto riportato in alcuni studi eseguiti sul piccolo intestino dei Mammiferi: sia nei roditori che nell'uomo, infatti, il maggior numero di cellule immunoreattive all'orexina-A è stato osservato nel segmento duodenale e queste sono state identificate come cellule enterocromaffini (Kirchgessner and Liu, 1999; Kirchgessner A.L., 2002; Nakabayashi et al., 2003). E' quindi ipotizzabile che, come nei Mammiferi, anche nei Vertebrati non-mammiferi tale peptide possa

svolgere effetti biologici del tutto simili a quelli della 5-HT o modulare le azioni della stessa amina biogena, influenzando la secrezione e la motilità del viscere durante la digestione e l'assorbimento.

Cellule immunoreattive all'orexina-A sono state rinvenute anche nel colo-retto, esclusivamente lungo l'epitelio di rivestimento dei villi dei ciechi. Per la mancanza di dati inerenti la presenza di tale peptide nel cieco dei Vertebrati superiori, il riscontro di cellule positive in queste strutture anatomiche tipiche degli Uccelli, suggerisce un coinvolgimento di tale peptide nella modulazione di attività funzionali specifiche che si realizzano in questo distretto. In particolare, nei ciechi dei gallinacci, animali erbivori ed onnivori, si sviluppa una ricca flora microbica in grado di attaccare materiali contenenti cellulosa, rendendoli così disponibili alla digestione e al successivo assorbimento. E' possibile, quindi, che nei ciechi di pollo l'orexina-A stimoli la secrezione e la peristalsi per favorire i processi digestivi.

Meno significativi sono stati i risultati inerenti la presenza di immunoreattività all'orexina-B nel tratto gastroenterico di pollo, avendo riscontrato cellule positive soltanto nell'epitelio ghiandolare dell'ileo e nell'epitelio dei villi dei ciechi. Il pattern distributivo e le caratteristiche morfologiche delle cellule immunoreattive all'orexina-B in questi due segmenti intestinali sono risultati del tutto sovrapponibili a quanto già riportato per l'orexina-A. Di conseguenza

anche l'orexina-B potrebbe intervenire nella modulazione di alcune attività locali, riferito, in particolare, alla secrezione ed alla peristalsi intestinale. La scarsa immunoreattività a tale peptide nel pollo, può essere imputabile alle minime differenze strutturali esistenti tra questa specie ed i Mammiferi.

L'immunoreattività alla orexina-A ed alla orexina-B nel tratto gastroenterico di spigola ha presentato un pattern distributivo molto simile e ha interessato elementi cellulari, corpi neuronali e fibre nervose. Nello stomaco diverse cellule reattive ad entrambe le orexine, per lo più tondeggianti od ovalari, sono state osservate nella porzione superiore e nel terzo medio delle pieghe mucose della regione cardiaca; decisamente più numerose sono state le cellule positive, di forma allungata, con un prolungamento a contatto con il lume, e riscontrate in corrispondenza dell'epitelio delle ghiandole gastriche della porzione pilorica per quanto riguarda l'orexina-A, e lungo il margine delle pieghe mucose per l'orexina-B. Sebbene la caratterizzazione del tipo cellulare sintetizzante le orexine necessiti di ulteriori indagini ultrastrutturali, sulla base della localizzazione e delle caratteristiche morfologiche delle cellule positive è possibile affermare che i risultati ottenuti nella spigola siano perfettamente sovrapponibili a quelli ottenuti in questo studio nel proventriglio di pollo ed a quelli precedentemente citati e discussi per i Mammiferi (Kirchgessner and Liu, 1999; Kirchgessner A.L., 2002; Nakabayashi

et al., 2003). Ne consegue che, oltre ad ipotizzare un intervento delle orexine nella regolazione di alcune attività locali (secrezione acida e svuotamento gastrico) dell'apparato digerente dei Pesci, si conferma l'alto grado di conservazione del peptide nel corso dell'evoluzione filogenetica (Kaslin et al., 2004). Bisogna inoltre considerare che sono risultate positive esili fibre nervose e alcuni neuroni nella tunica muscolare delle tre regioni gastriche. L'immunoreattività della componente nervosa fa presupporre un coinvolgimento della orexina-A nella trasmissione di segnali, attraverso le afferenze vagali, dal tratto gastroenterico al SNC per la regolazione della motilità gastrica.

Oltre che nello stomaco, immunoreattività ad entrambe le orexine è stata parimenti osservata nell'intestino di spigola e nell'intestino di *Carassius auratus*, sebbene la densità e l'intensità delle cellule positive siano andate progressivamente scemando procedendo verso i segmenti distali. Le cellule reattive, tipicamente endocrine data la presenza di uno o due prolungamenti a contatto con il lume, sono state principalmente localizzate nella porzione basale dell'epitelio mucoso dei villi. Un simile pattern distributivo, associato alle caratteristiche delle cellule positive alle orexine, è stato descritto in precedenza sia negli Uccelli che nei Mammiferi, suggerendo che anche nei Pesci tali peptidi esercitino un controllo locale diretto su alcune funzioni dell'intestino. Nell'intestino dei pesci oggetto della seguente ricerca, l'immunoreattività all'orexina-A ed

all'orexina-B non ha interessato solo elementi cellulari, ma anche neuroni e fibre del plesso mienterico e, seppure più raramente, della tunica sottomucosa soprattutto in corrispondenza del segmento medio. Tale situazione concorda con quanto riportato in diverse specie di roditori, in cui è stata documentata immunoreattività alle orexine di neuroni e fibre del Sistema Nervoso Enterico (SNE) lungo tutto il piccolo intestino, sebbene l'addensamento maggiore sia stato riscontrato nel duodeno (Kirchgessner and Liu, 1999; Kirchgessner A.L., 2002). Simili risultati hanno suggerito l'intervento delle afferenze vagali nella trasmissione di segnali generati da tale peptide e destinati alle aree ipotalamiche che presiedono alla regolazione di alcune attività del tratto gastroenterico dei Mammiferi (motilità, secrezione e circolazione viscerale). Inoltre, la reattività del plesso mienterico supporterebbe l'ipotesi che nei Pesci le orexine partecipino, unitamente ai centri superiori, al controllo della attività motoria intestinale.

Fino ad oggi, si sosteneva che le orexine fossero coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi energetica nei Pesci sulla base di pochi dati anatomici inerenti la presenza di cellule sintetizzanti tali peptidi nelle stesse aree ipotalamiche implicate nel controllo dell'assunzione di cibo nei Mammiferi (Kaslin et al., 2004), e su alcuni studi fisiologici dimostranti che iniezioni icv di orexina erano in grado di stimolare il consumo di cibo nel *Carassius auratus* interagendo con diversi

neuropeptidi regolatori dell'appetito (Volkoff et al., 1999; Volkoff and Peter, 2001b). La dimostrazione della presenza di orexina-A e di orexina-B nel tratto gastroenterico supporta l'ipotesi di una eventuale interazione tra questi peptidi ed altri sistemi peptidergici sintetizzati in loco per il controllo a breve termine dell'assunzione di cibo.

Considerando che nei Mammiferi le orexine regolano anche l'omeostasi dei fluidi (Smart and Jerman, 2002), data la positività di neuroni e fibre del SNE nell'intestino dei teleostei, è verosimile presumere che nei Pesci tali molecole partecipino attivamente alla regolazione iono-osmotica. Le specie acquatiche, infatti, devono mantenere una concentrazione ionica intracellulare costante e compatibile con i processi biochimici e fisiologici, vivendo immerse in un mezzo le cui caratteristiche idro-saline possono risultare abbastanza diverse. Ad esempio, i teleostei d'acqua dolce (*Carassius auratus*) presentano una salinità nei fluidi corporei maggiore rispetto a quella dell'ambiente (sono quindi iperosmotici), per cui tendono ad assumere acqua ed elettroliti per osmosi attraverso i tessuti osmoregolatori (branchie, reni ed intestino); i teleostei d'acqua salata (*Dicentrarchus labrax*) presentano, invece, una minore salinità nei fluidi corporei rispetto a quella dell'ambiente (sono quindi iposmotici), per cui tendono a perdere acqua per osmosi attraverso i suddetti tessuti. Questi scambi di ioni e acqua sono controllati dal Sistema Nervoso Autonomo (SNA) di cui fanno parte fibre simpatiche e

parasimpatiche appartenenti anche al SNE. Perciò, l'interessamento della suddetta componente nervosa più giustificare l'eventuale regolazione da parte delle orexine del bilancio idro-salino che caratterizza i Pesci Teleostei.

10.4. GLP-1

Le molecola di pro-glucagone è stata sequenziata e caratterizzata nelle varie classi di Vertebrati, mostrando una notevole omologia strutturale nel corso dell'evoluzione filogenetica dai Vertebrati non-mammiferi ai Mammiferi (Irwin D.M., 2001). Tuttavia, mentre il pro-glucagone dei Mammiferi contiene una singola sequenza codificante per glucagone, GLP-1 e GLP-2, in alcune specie di Pesci, Anfibi, Rettili ed Uccelli sono stati individuati nella molecola precursore dei siti di clivaggio alternativi, caratterizzanti i tessuti d'origine, che consentono la trascrizione solo di glucagone e GLP-1, inibendo la sintesi di GLP-2 in alcuni distretti organici, (Irwin and Wong, 1995; Irwin et al., 1997) o codificano per un differente numero di GLP-1 (Yeung and Chow, 2001). Negli Uccelli, ed in particolare nel pollo, non sono riportate peculiarità circa la sintesi del peptide GLP-1, che ha mostrato una sequenza aminoacidica del tutto sovrapponibile a quella dei Mammiferi (Irwin D.M., 2001), quindi è verosimile ipotizzare un pattern distributivo ed azioni biologiche del

tutto sovrapponibili tra queste due classi di Vertebrati. A conferma di ciò, nel tratto gastroenterico di pollo cellule immunoreattive al GLP-1 sono state osservate esclusivamente nella porzione basale delle ghiandole tubulari composte di ileo superiore e inferiore. Infatti, anche nei Mammiferi il principale sito di produzione di tale peptide è risultato essere questo segmento intestinale (Holst J.J., 1997). Inoltre, il numero di cellule positive, proprio come descritto nei Mammiferi, è andato aumentando dall'ileo superiore a quello inferiore. Oltre al pattern di distribuzione, anche le caratteristiche morfologiche delle cellule sintetizzanti GLP-1 nel pollo sono del tutto sovrapponibili a quanto riportato in precedenza nell'intestino dei Mammiferi. Quindi, sulla base dei seguenti dati anatomici è possibile ipotizzare per tale peptide effetti fisiologici del tutto paragonabili a quelli descritti per i Mammiferi, con particolare riferimento al rallentamento dello svuotamento gastrico, all'inibizione della secrezione acida e all'aumento del senso di sazietà che incidono fortemente sui meccanismi di controllo centrale dell'appetito (Turton et al., 1996).

L'analisi filogenetica della molecola di proglucagone ha evidenziato un differente ritmo evolutivo del GLP-1 tra Pesci e Mammiferi, che potrebbe spiegare, almeno in parte, le differenti funzioni fisiologiche di tale peptide in queste due classi di Vertebrati (Irwin D.M., 2001). Infatti, è stato ormai accertato da tempo che, a

differenza di quanto riportato nei Mammiferi, il GLP-1 dei Pesci è dotato di una spiccata attività glucagone-simile, essendo in grado di stimolare la gluconeogenesi e la glicogenolisi epatica (Plisetskaya and Mommsen, 1996). Nonostante i differenti effetti sul metabolismo glucidico, il GLP-1 ha mostrato una simile distribuzione immunoistochimica tra le specie di teleostei oggetto della seguente ricerca ed i Mammiferi. Infatti, sia nel *Dicentrarchus labrax* che nel *Carassius auratus*, l'immunoreattività al GLP-1 ha interessato pochi elementi cellulari e una abbondante componente nervosa, maggiormente concentrati nell'intestino medio e destinati a scemare verso il segmento distale. Nei Pesci Teleostei tale segmento intestinale corrisponde all'intestino tenue dei Mammiferi, principale sito di produzione del GLP-1 (Holst J.J., 1997). Anche la morfologia delle cellule positive, sebbene scarsamente numerose, ha ricordato le caratteristiche delle cellule sintetizzanti GLP-1 nei Mammiferi. La corrispondenza tra distribuzione e tipo cellulare coinvolto, suggerisce che la differente azione metabolica del GLP-1 nei Pesci e nei Mammiferi è da attribuire al coinvolgimento di due diverse classi di molecole recettoriali. Recentemente, Yeung et al (2002) hanno isolato e caratterizzato funzionalmente il recettore per il GLP-1 (GLP-1R) nel *Carassius auratus*, evidenziandone l'elevata omologia strutturale con il glucagone umano. Quindi, è verosimile che nel corso dell'evoluzione filogenetica nei Pesci si realizzi la perdita del gene codificante per il

recettore del GLP-1 e, di conseguenza, dell'azione insulino-simile, per cui tale peptide agirebbe attraverso il recettore del glucagone simulando gli effetti biologici di quest'ultimo.

Bisogna, inoltre, considerare che in entrambe le specie di pesci sono risultati positivi anche un discreto numero di corpi neuronali e numerose fibre nervose del plesso mienterico nell'intestino medio. Il coinvolgimento del plesso mienterico supporta l'ipotesi che, come nei Mammiferi, anche nei Pesci il GLP-1 possa influenzare negativamente l'attività motoria del tratto gastrointestinale inviando, attraverso le afferenze vagali, dei segnali ai centri superiori deputati al controllo delle attività funzionali del viscere (Hellstrom and Naslund, 2001).

In alcuni studi precedenti, è stato dimostrato che iniezioni icv di GLP-1 inibiscono fortemente l'assunzione di cibo in alcune specie di Uccelli e di Pesci (Furuse et al., 1997; Silverstein et al., 2001). Quindi, la presenza di elementi cellulari e di fibre reattive al GLP-1 nel tratto gastroenterico delle specie studiate, permette di ipotizzare una mediazione non solo centrale, ma anche periferica nell'espletamento dell'effetto anoressizzante di tale peptide.

CAPITOLO 11.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il tratto gastroenterico, oltre ad avere il compito di trasformare ed assimilare il cibo per garantire all'organismo animale un rifornimento adeguato di materia ed energia, è anche un importante organo endocrino, in quanto sintetizza e secerne molteplici sostanze in grado di agire sia in loco che su diversi tessuti bersaglio. Alcune di queste molecole esercitano i loro effetti sul SNC, in particolare sui circuiti neuronali che regolano l'appetito, partecipando, attivamente al mantenimento dell'omeostasi energetica. Sulla base dei risultati ottenuti nella presente ricerca, tale funzione sembra realizzarsi non solo nei Mammiferi ma anche in alcune classi di Vertebrati non-mammiferi (Pesci e Uccelli). Infatti, la presenza nell'apparato digerente di pollo e di pesci di alcuni peptidi influenzanti l'appetito, quali, grelina, orexina-A, orexina-B, leptina e glucagon-like peptide-1, sintetizzati anche in alcuni distretti ipotalamici, avvalorano sempre più il concetto che il tratto gastroenterico non assolva esclusivamente a funzioni nutritive, ma sia una componente essenziale di ciascun animale, partecipando attivamente alla regolazione di svariate funzioni vitali, come l'assunzione di cibo ed il mantenimento del peso corporeo, comportandosi, in definitiva, come un "piccolo cervello".

La differente conformazione anatomica del tratto gastroenterico e le peculiari caratteristiche delle diete alimentari delle specie esaminate, non hanno inciso nella espressione di tali peptidi, essendo stato osservato un pattern distributivo sovrapponibile sia tra Uccelli e Pesci, che tra questi ed i Mammiferi. E' ipotizzabile, quindi, che nel corso dell'evoluzione filogenetica dai Vertebrati non-mammiferi ai Mammiferi, i suddetti peptidi abbiano mantenuto un alto grado di conservazione sia morfologica che funzionale. Inoltre, è possibile ritenere che tali molecole svolgano un ruolo fondamentale non solo nella modulazione di molteplici attività locali (secrezione e motilità del tratto gastrointestinale) ma soprattutto nel controllo dell'appetito. In tal senso i nostri risultati costituiscono dei dati importanti per la ulteriore comprensione delle complesse interazioni che si realizzano tra il SNC e la periferia per il controllo dell'appetito e del peso corporeo, soprattutto, nelle specie di allevamento per le quali l'incremento ponderale è di fondamentale importanza per l'ottimizzazione delle produzioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E. and Flier J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**: 250-252.
2. Ahima R.S., Saper C.B., Flier J.S. and Elmquist J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine system. *Front Neuroendocrinol*, **21**: 263-307.
3. Ahmed S. and Harvey S. (2002). Ghrelin: a hypothalamic Gh-releasing factor in domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol*, **172**: 117-125.
4. Allen Y.S., Adrian T.E., Allen J.M., Takemoto K., Crow T.J., Bloom S.R. and Polak J.M. (1983). Neuropeptide Y distribution in rat brain. *Science*, **221**: 877-879.
5. Alvarez C.E. and Sutcliffe J.G. (2002). Hypocretin is an early member of the incretin gene family. *Neurosci Lett*, **324(3)**: 169-72.
6. Alvarez E., Roncero I., Chowen J.A., Thorens B. and Balzques E. (1996). Expression of the glucagons-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem*, **66**: 920-927.
7. Andreis P.G., Malendowicz L.K., Trejter M., Neri G., Spinazzi R., Rossi G.P. and Nussdorfer G.G. (2003). Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal

- cortex: evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett*, **536**: 173-179.
8. Ariyasu H., Takaya K., Tagami T., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Suda M., Koh T., Natsui K., Toyooka S., Shirakami G., Usui T., Shimatsu A., Doi K., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K. and Nakao K. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**: 4753-4758.
 9. Arvat E., Di Vito L., Taccagno B., Broglio F., Boghen M.F., Deghenghi R., Capanni F. and Ghigo E. (1997). Effects of GHRP-2 and hexarelin, two synthetic GH-releasing peptides, on GH, prolactin, ACTH and cortisol levels in man. Comparison with the effects of GHRH, TRH and hCRH. *Peptides*, **18**: 885-891.
 10. Ashwell C.M., Czerwinski S.M., Brocht D.M. and McMurtry J.P. (1999). Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. *Am J Physiol*, **276**: 226-232.
 11. Bado A., Levasseur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau J.P., Bortoluzzi M.N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M. et al. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*, **394**: 790-793.

12. Bai F.L., Yamano M., Shiotani Y., Emson P.C., Smith A.D., Powell J.F. and Tohyama M. (1985). An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res*, **331**: 172-175.
13. Baker B.I. (1991). Melanin-concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. *Int Rev Cytol*, **126**: 1-47.
14. Baldanzi G., Filigheddu N., Cutrupi S., Catapano F., Bonissoni S., Fubini A., Malan D., Baj G., Granata R., Broglio F., Capotti M., Surico N., Bussolino F., Isgaard J., Deghenghi R., Sinigaglia F., Prat M., Muccioli G., Ghigo E. and Graziani A. (2002). Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol.*, **159(6)**: 1029-37.
15. Barrenetxe J., Villaro A.C., Guembe L., Pascual I., Muñoz-Navas M., Barber A. and Lostao M.P. (2002). Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut*, **50(6)**: 797-802.
16. Baskin D.G., Hahn T.M. and Schwartz M.W. (1999). Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res*, **31(5)**: 345-50.

17. Bergendahl M., Wiemann J.N., Clifton D.K., Huhtaniemi I. and Steiner R.A. (1992). Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology*, **56**: 913-920.
18. Bernardis L.L. and Bellinger L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*, **20**: 189-287.
19. Bittencourt J.C., Presse F., Arias C., Peto C., Vaughan J., Nahon J.L. et al. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, **319**: 218-45.
20. Bjorbaek C., Uotani S., de Silva B. and Flier J.S. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin. *J Biol Chem*, **272**: 32686-32695.
21. Bjorbaek C., Elmquist J.K., Michl P., Ahima R.S. and van Bueren A. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*, **139**: 3485-3491.
22. Bjorbaek C. and Kahn B.B. (2004). Leptin signalling in the central nervous system and the periphery. *Rec Progr Horm Res*, **59**: 305-331.
23. Blundell J.E. (1984). Serotonin and appetite. *Neuropharmacology*, **23**: 1537-1551.

24. Blundell J.E. (1986). Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. *Appetite*, **7**: 33-37.
25. Blundell J.E. and Hill A.J. (1993). Eating disorders in relation to obesity: semantic or fact? The psychobiological control of appetite. *Advance in Bioscience Pergamon Press LTD, Great Britain*, **90**: 3-9.
26. Bodart V., Febbraio M., Demers A., McNicoll N., Pohankova P., Perreault A., Sejlitz T., Escher E., Silverstein R.L., Lamontagne D. and Ong H. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the hearth. *Circ Res*, **90**: 844-849.
27. Boschmann M., Frenz U., Murphy C.M. and Noack R. (1996). Changes in energy metabolism and metabolite patterns of obese rat after application of dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav*, **53**: 549-558.
28. Bosi G., Di Giancamillo A., Arrighi S. and Domeneghini C. (2004). An immunohistochemical study on the neuroendocrine system in the alimentary canal of the brown trout, *Salmo trutta*, L., 1758. *Gen Comp Endocrinol*, **138**: 166-81.
29. Bowers C.Y. (1998). Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci*, **54**: 1316-1329.

30. Brady L.S., Smith M.A., Gold P.W. and Herkenham M. (1990). Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*, **52**: 441-447.
31. Bray G.A. (1996). Static theories in a dynamic world: a glucodynamic theory of food intake. *Obes Res*, **4**: 489-492.
32. Broberger C., Johansen J., Johansson C., Schalling M. and Hokfelt T. (1998a). The neuropeptide Y/ agouti gene-related protein (AgRP) brain circuitry in normal, anorectic and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci*, **95**: 15043-8.
33. Broberger C., de Lecea L., Sutcliffe J.G. and Hokfelt T. (1998b). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein system. *J Comp Neurol*, **402**: 460-474.
34. Bullock B.P, Heller R.S. and Habener J.F. (1996). Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagons-like peptide-1 receptor. *Endocrinology*, **137**: 2156-2164.
35. Cammisotto P.G., Renaud C., Gingras D., Delvin E., Levy E. and Bendayan M. (2005). Endocrine and exocrine secretion

- of leptin by the gastric mucosa. *J Histochem Cytochem*, **53(7)**: 851-860.
36. Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R. and Burn P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, **269**: 546-549.
37. Cassoni P., Papotti M., Ghe C., Catapano F., Sapino A., Graziani A., Deghenghi R., Reissmann T., Ghigo E. and Cuccioli G. (2001). Identification, characterization and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**: 1738-1745
38. Castracane V.D., Kraemer R.R., Franken M.A., Kraemer G.R. and Gimpel T. (1998). Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril*, **70**: 472-477.
39. Chehab F.F., Lim M.E. and Lu R. (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, **12**: 318-320.
40. Chen C.T., Hwang L.L., Chang J.K. and Dune N.J. (2000). Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral

- ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **278**: R692-R697.
41. Cheung C.C., Clifton D.K. and Steiner R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, **138**: 4489-4492
 42. Cinti S., Matteis R., Pico C., Ceresi E., Obrador A., Maffei C., Oliver J. and Palou A. (2000). Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes*, **24**: 789-793.
 43. Cinti S., De Matteis R., Ceresi E., Pico C., Oliver J., Oliver P., Palou A., Obrador A. and Maffei C. (2001). Leptin in the human stomach. *Gut*, **49**: 155.
 44. Cohen S.M., Werman J. and Tota M. (1998). ¹³C NMR study of the effects of leptin treatment on kinetics of hepatic intermediary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 7385-90.
 45. Cone R.D. (1999). The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, **10(6)**: 211-216.
 46. Considine R.V. and Caro J.F. (1997). Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**: 1255-1272.
 47. Couceyro P.R., Koylu E.O. and Kuhar M.J. (1997). Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat*, **12**: 229-241.

48. Crawley J.N. (1995). Biological actions of galanin. *Reg Pept*, **59**: 1-16.
49. Cummings E., Purnell J.Q., Frayo S.R., Schmidova K., Wisse B.E. and Weigle D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**: 1714-1719.
50. Curzon G. (1990). Serotonin and appetite. *Ann NY Acad Sci*, **600**: 521-530.
51. Curzon G., Gibson E.L. and Oluyomi A.O. (1997). Appetite suppression by commonly used drugs depends on 5-HT receptors but not 5-HT availability. *TIPS*, **18**: 21-25.
52. Date Y., Ueta Y., Yamashita H., Yamaguchi H., Matsukura S., Kangawa K., Sakurai T., Yanagisawa M. and Nakazato M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory system. *Neurobiology*, **96**: 748-753.
53. Date Y, Kojima M., Hosoda H., Sawaguchi A., Mondal M.S., Suganuma T., Matsukura S., Kangawa K. and Nakazato M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and human. *Endocrinology*, **141**: 4255-4266.

54. Date Y., Nakazato M., Murakami N., Kojima M., Kangawa K. and Matsukura S. (2001). Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**: 904-907.
55. Date Y., Nakazato M., Hashiguchi S., Dazaki K., Mondal M.S., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Arima T., Matsuo H., Yada T. and Matsukura S. (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, **51**: 124-129.
56. de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X.-B., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L.F., Gautvik V.T., Bartlett F.S., Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M. and Sutcliffe J.G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 322-327.
57. De Matteis R., Dashtipour K., Ognibene A. and Cinti S. (1998). Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proc Nutr Soc*, **57**: 441-448.
58. Dhanvantari S., Seidah N.G. and Brubaker P.L. (1996). Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol*, **10**: 342-355.

59. Donahay J.C.K., Van Dijk G., Woods S.C. and Seeley R.J. (1998). Intraventricular GLP₁ reduces short- but not long-term food intake or body weight in lean and obese rats. *Brain Res*, **779**: 75-83.
60. Dornonville de la Cour C., Bjorkqvist M., Sandvik A.K., Bakke I., Zhao C.M., Chen D. and Hakanson R. (2001). A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* **99**: 141-150.
61. Douglass J., McKinzie A.A. and Couceyro P. (1995). PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci*, **15**: 2471-2481.
62. Doyon C., Drouin G., Trudeau V.L., and Moon T.W. (2001). Molecular evolution of leptin. *Gen Comp Endocrinol*, **124**: 188-198.
63. Drucker D.J. (1998). Glucagon-like peptides (Review). *Diabetes*, **47**: 59-168.
64. Dube M.G., Horvarth T.L., Kalra P.S. and Kalra S.P. (2000). Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin-A in sated rats. *Peptides*, **21**: 1557-60.
65. Dyer C.J., Touchette K.J., Carrol J.A., Allee G.L. and Matteri R.L. (1999). Cloning of porcine prepro-orexin cDNA and effects of an intramuscular injection of synthetic porcine

- orexin-B on feed intake in young pigs. *Domest Anim Endocrinol*, **16(3)**: 145-8.
66. Eberle A.N. (1988). Melanin-concentrating hormone. In *The Melanotropins (ed. Eberle A.N.)*, 321-332. Karger, Basel.
67. Elliott R.M., Morgan L.M., Tredger J.A., Deacon S., Wright J. and Marks V. (1993). Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in men: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol*, **138**: 159-166.
68. Elmquist J.K., Ahima R.S., Maratos-Flier E., Flier J.S. and Saper C.B. (1997). Leptin activates neurons in the ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, **138(2)**: 839-42.
69. Elmquist J.K., Ahima R.S., Elias C.F., Flier J.S. and Saper C.B. (1998a). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95(2)**: 741-746.
70. Elmquist J.K., Bjorbaek C., Ahima J.S., Flier J.S. and Saper C.B. (1998b). Distribution of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, **395**: 535-547.

71. Elmquist J.K., Elias C.F. and Saper C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, **22**: 221-32.
72. Escobar-Morreale H.F., Escobar del Rey F. and Morreale de Escobar G. (1997). Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology*, **138**: 4485-4488.
73. Fehm H.C., Peiser C and Bode H.P. (1997). Leptin a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides*, **18**: 1267-1273.
74. Fei H., Okano H.J., Li C., Lee G.H. and Zhao C. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 7001-7005.
75. Fernstrom J.D. and Wurtmann R.J. (1971). Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science*, **173**: 149-152.
76. Frankish H.M., Dryden S., Hopkins D., Wang Q. and Williams G. (1995). Neuropeptide Y. The hypothalamus and diabetes: insights into the central control of metabolism. *Peptides*, **16**: 757-71.
77. Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Lollman B., Lowell B.B. and Flier J.S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*, **1**: 1311-1314.

78. Friedman J.M. and Halaas J.L. (1998). Leptin and regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**: 763-770.
79. Friedman M.I., Tordoff M.G. and Ramirez I. (1986). Integrated metabolic control of food intake. *Brain Res Bull*, **17**: 855-859.
80. Friedman M.I., Harris R.B., Ji H., Ramirez I. and Tordoff M.G. (1999). Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol*, **276**: R1046-1053.
81. Frühbeck G., Aguado M. and Martinez J.A. (1997). In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**: 590-594.
82. Fulton S., Woodside B. and Shizgal P. (2000). Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science*, **287**: 125-128.
83. Furuse M., Matsumoto M., Okumura J., Sugahara K. and Hasegawa S. (1997). Intracerebroventricular injection of mammalian and chicken glucagon-like peptide-1 inhibits food intake of the neonatal chick. *Brain Res*, **755**: 167-169.
84. Gainsford T., Willson T.A., Metcalf D., Handman E., McFarlane C., Ng A., Nicola N.A., Alexander W.S. and Hilton D.J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation and functional activation of hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 14564-14568.

85. Galas L., Vaudry H., Braun B., van den Pol A.N., de Lecea L., Sutcliffe J.G. and Chartrel N. (2001). Immunohistochemical localization and biochemical characterization of hypocretin/orexin-related peptides in the central nervous system of the frog (*Rana ridibunda*). *J Comp Neurol*, **429(2)**: 242-252.
86. Galas L., Chartrel N., Kojima M., Kangawa K. and Vaudry H. (2002). Immunohistochemical localization and biochemical characterization of ghrelin in the brain and stomach of the frog *Rana esculenta*. *J Comp Neurol*, **450**: 34-44.
87. Glass M., Dragunow M. and Faull R.L.M. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, **77**: 299-318.
88. Goke R., Larsen P.J., Mikkelsen J.D. and Sheikh S.P. (1995). Identification of a specific binding sites for glucagon-like peptide-1 on the posterior lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinol*, **62**: 130-134.
89. Grunfeld C., Zhao C., fuller J. and Pollack A. (1996). Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the gene ob product, in hamsters. *J Clin Invest*, **97**: 2152-2157.

90. Gualillo O., Caminos J.E., Blanco M., Garcia-Caballero T., Kojima M., Kangawa K., Dieguez C. and Casanueva F.F. (2001). Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*, **142**: 788-794.
91. Guan X.M., Yu H., Palyha O.C., McKee K.K., Feighner S.D., Sirinathsinghji D.J., Smith R.G., van der Ploeg L.H. and Howard A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissue. *Brain Res Mol Brain Res*, **48**: 23-29.
92. Guilmeau S., Buyse M. and Bado A. (2004). Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function. *Curr Opin Pharmacol*, **4**: 561-566.
93. Haalas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K. and Friedman J.M. (1995). Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, **269**: 543-546.
94. Hagan M.M., Rushing P.A., Schwartz M.W., Yagaloff K.A., Burn P., Woods S.C. and Seeley R.J. (1999). Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J Neurosci*, **19**: 2362-2367.
95. Hagan M.M., Rushing P.A., Pritchard L.M., Schwartz M.W., Strack A.M., Van der Ploeg L.H., Woods S.C. and Seeley R.J. (2000). Long-term orexigenic effects of AgRP-(82-132)

- involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279**: R47-52.
96. Hagan M.M., Rushing P.A., Benoit S.C., Woods S.C. and Seeley R.J. (2001). Opioid receptor involvement in the effect of AgRP-(82-132) on food intake and food selection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**: R814-21.
97. Harder W. (1975). Anatomy of fishes. Ed. *Scweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Science Publishers, Stuttgart*.
98. Harrold J.A., Widdowson P.S. and Williams G. (1999). Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4 (MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R) receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes*, **48**: 267-271.
99. Hellstrom P.M. and Naslund E. (2001). Interactions between gastric emptying and satiety, with special reference to glucagon-like peptide-1. *Physiol Behav*, **74(4-5)**: 735-41.
100. Hibiya T. (1982). An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Ed. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*.
101. Hodges R.D. (1974). The histology of the fowl. *New York: Academic Press*.

102. Hoggard N., Hunter L., Duncan J. and Williams L. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *PNAS*, **94**: 11073-11078.
103. Hoggard N., Hunter L., Trayhurn P., Williams P. and Mercer S.W. (1998). Leptin and reproduction. *Proc Nutr Soc*, **57**: 421-427.
104. Holst J.J. (1997). Enteroglucagon. *Ann Rev Physiol*, **59**: 257-271.
105. Holst J.J. (1999). Glucagon-like peptide-1, a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential. *Curr Med Chem*, **6(11)**: 1005-1017.
106. Horvarth T.L., Kalra S.P., Naftolin F. and Leranth C. (1995). Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, **7**: 579-588.
107. Horvarth T.L., Diano S. and van den Pol A.N. (1999). Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci*, **19**: 1072-1087.
108. Hosoda H., Kojima M., Matsuo H. and Kangawa K. (2000). Purification and characterization of rat des-Gln¹⁴-

- Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, **275**: 21995-22000.
109. Huang L., Wang Z. and Li C. (2001). Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem*, **276**: 6343-6349.
110. Hungs M. and Mignot E. (2001). Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. *Bioessays*, **23**: 397-401.
111. Huszar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V., Dunmore J.H., Fang Q., Berkemeier L.R., Gu W., Kesterson R.A, Boston B.A., Cone R.D., Smith F.J., Campfield L.A., Burn P. and Lee F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, **88**: 131-141.
112. Imeryüz N., Yegen B.C., Bozkurt A., Coskun T., Villanueva-Penacarrillo M.L. and Ulusoy N.B. (1997). Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol*, **273**: G920-927.
113. Irwin D.M. and Wong J. (1995). Trout and chicken proglucagon: alternative splicing generates mRNA transcripts encoding glucagon-like peptide-2. *Mol Endocrinol*. **9**: 267-277.
114. Irwin D.M., Satkunarajah M., Wen Y., Brubaker P.L., Pederson R.A. and Wheeler M.B. (1997). The *Xenopus* proglucagon gene encodes novel GLP-1-like peptides with insulinotropic properties. *Proc Natl Acad Sci*, **94**: 7915-7920.

115. Irwin D.M. (2001). Molecular evolution of proglucagon. *Regul Pept*, **98**: 1-12.
116. Jacobowitz D.M. and O'Donohue T.L. (1978). α -Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**: 6300-6304.
117. Jain M.R., Horvarth T.L., Kalra P. S. and Kalra S.P. (2000). Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regul Pept*, **87**: 19-24.
118. Jensen J. Review (2001). Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A*, **128**: 471-479
119. Jin L., Zhang S., Burguera B.G., Couce M.E., Osamura R.Y., Kulig E. and Lloyd R.V. (2000). Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, **141**: 333-339.
120. Jin S.L.C., Han V.K.M., Simmons J.G., Towle A.C., Lauder J.M. and Lund P.K. (1988). Distribution of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucagons and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol*, **271**: 519-532.

121. Johnson A.K. and Gross P.M. (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J*, **7**: 683-686.
122. Johnson R.M., Johnson T.M. and Londraville R.L. (2000). Evidence for leptin expression in fishes. *J Exp Zool*, **286**: 718-724.
123. Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Koda A., Yamamoto K., Kitajima Y., Matsumoto M., Minamitake Y., Kikuyama S. and Kangawa K. (2001). Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at the third threonine residue. *J Biol Chem*, **276**: 40441-40448.
124. Kaiya H., Van Der Geyten S., Kojima M., Hosoda H., Kitajima Y., Matsumoto M., Geelissen S., Darras V.M. and Kangawa K. (2002). Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning and biological activity. *Endocrinology*, **143(9)**: 3454-3463.
125. Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Riley L.G., Hirano T., Grau E.G. and Kangawa K. (2003a). Amidated fish ghrelin: purification cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*, **176**: 415-423.
126. Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Riley L.G., Hirano T., Grau E.G. and Kangawa K. (2003b). Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release

- in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **135**: 421-429.
127. Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Moriyama S., Takahashi A., Kawauchi H. and Kangawa K. (2003c). Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, **144(12)**: 5215-5226.
128. Kalra S.P., Dube M.G., Pu S., Xu B., Horvath T.L. and Kalra P.S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, **20**: 68-100.
129. Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H. and Wakabayashi I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, **50**: 2438-2443.
130. Kamohara S., Burcelin R. and Halaas J.L. (1997). Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, **389**: 374-377.
131. Kanse S.M., Kreymann B., Ghatei M.A and Bloom S.R. (1988). Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Lett*, **241**: 209-212.

132. Kaslin J., Nystedt J.M., Ostergard M., Peitsaro N. and Panula P. (2004). The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J Neurosci*, **24(11)**: 2678-89.
133. Kawauchi H., Kawazoe I., Tsubokawa M., Kishida M. and Baker B.I (1983). Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, **305**: 321-3.
134. Kieffer T.J., McIntosh C.H. and Pederson R.A. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagons-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl-peptidase IV. *Endocrinology*, **136**: 3585-3596.
135. Kirchgessner A.L. and Liu M. (1999). Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron*, **24(4)**: 941-51.
136. Kirchgessner A.L. (2002). Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev*, **23(1)**: 1-15.
137. Kirkham T.C., Williams C.M., Fezza F. and Di Marzo V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*, **136**: 550-557.
138. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H. and Kangawa K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**: 656-660.

139. Kojima M., Hosoda H., Matsuo H. and Kangawa K. (2001). Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab*, **2(3)**: 118-122
140. Korbonits M., Kojima M., Kangawa K. and Grossman A.B. (2001). Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine*, **14**: 101-104.
141. Kreymann B., Williams G., Ghatei M.A. and Bloom S.R. (1987). Glucagon-like peptide-1, 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, **2**: 1300-1304.
142. Kreymann B, Ghatei M.A., Burnet P., Williams G., Kanse S., Diani A.R. and Bloom S.R. (1989). Characterization of glucagon-like peptide-1- 7-36amide in the hypothalamus. *Brain Res*, **502**: 325-331.
143. Kristensen P., Judge M.E., Thim L., Ribel U., Christjansen K.N., Wulff B.S., Clausen J.T, Jensen P.B., Madsen O.D., Vrang N., Larsen P.J. and Hastrup S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, **393**: 72-76.
144. Krowicki Z.K., Burmeister M.A., Berthoud H.R., Scullion R.T., Fuchs K. and Hornby P.J. (2002). Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potently stimulate gastric motor

- function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **283**(2): G465-72.
145. Kuhar M.J. and Dal Vechia S.E. (1999). CART peptides: Novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends Neurosci*, **22**: 316-320.
146. Kunii K., Yamanaka A., Nambu T., Matsuzaki I., Goto K. and Sakurai T. (1999). Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res*, **842**: 256-261.
147. Kyrkouli S.E., Stanley B.G., Seirafi R.D. and Leibowitz S.F. (1990). Stimulation of feeding by galanin; anatomical localization and behavioural specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides*, **11**: 995-1001.
148. Kyrkouli S.E., Stanley B.G. and Leibowitz S.F. (1992). Differential effects of galanin and neuropeptide Y on extracellular norepinephrine levels in the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat: a microdialysis study. *Life Sci*, **51**: 203-210.
149. Lankat-Buttgereit B., Goke R., Fehmann H.-C., Richter G. and Goke B. (1994). Molecular cloning of cDNA for the GLP-1 receptor expressed in rat lung. *Exp Clin Endocrinol*, **102**: 341-347.
150. Lefebvre P.J. (1999). Glucagon and its family revisited. *Diabetes Care*, **18**: 715-30.

151. Leibowitz S.F., Weiss G.F. and Shor-Posner G. (1988). Hypothalamic serotonin: pharmacological, biochemical and behavioral analyses of its feeding-suppressive action. *Clin Neuropharmacol*, **11**: 51-71.
152. Leroy P., Dessolin S., Villageois P., Moon B.C., Friedman J.M., Ailhaud G. and Dani C. (1996). Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem*, **271**: 2365-2368.
153. Lewin K.J. (1986). The endocrine cells of the gastrointestinal tract. The normal endocrine cells and their hyperplasias. *Pathol Annu*, **1**: 1-27.
154. Lewin M.J. and Bado A. (2001). Gastric leptin. *Microsc Res Tech*, **53**: 372-376.
155. Li H., Matheny M. and Scarpace M.J. (1997). Beta 3-adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. *Am J Physiol*, **272**: 1031-1036.
156. Lord G.M., Matarese G., Howard J.K., Baker R.J., Bloom S.R. and Lechler R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, **394**: 897-901.
157. Lovenberg T.W., Liaw C.W., Grigoriadis D.E., Clevenger W., Chalmers D.T., De Souza E.B. and Oltersdorf T. (1995). Cloning and characterization of a functionally distinct

- corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 836-840.
158. Lu S., Guan J.L., Wang Q.P., Uehara K., Yamada S., Goto N., Date Y., Nakazato M., Kojima M., Kangawa K. and Shioda S. (2002). Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, **321**: 157-160.
159. Mácajová M., Lamošová D. and Zeman M. (2004). Role of leptin in farm animals: a review. *J Vet Med*, **51**: 157-166.
160. Madej T., Boguski M.S. and Bryant S.H. (1995). Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett*, **373**: 13-18.
161. Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R.E., Lee G.H., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R. et al. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, **1**: 1155-1161.
162. Marsh D.J., Hollopeter G., Huszar D., Laufer R., Yagaloff K.A., Fisher S.L., Burn P. and Palmiter R.D. (1999). Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet*, **21**: 119-122.
163. Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., Ohnuma N., Tanaka S., Itoh Z., Hosoda H., Kojima M. and Kangawa K. (2000).

- Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **276**: 905-908.
164. Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., Mise H., Nishimura H., Yoshimasa Y., Tanaka I., Mori T. and Nakao K. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, **3**: 1029-1033.
165. Mayer J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N Engl J Med*, **249**: 13-16.
166. McCann S., Kimura M., Walczewska A., Karanth S., Rettori V. and Yu W. (1998). Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRF, cytokines, leptin and nitric oxide. *Neuroimmunomodulation*, **5**: 193-202.
167. McKibbin P.E., Cotton S.J., McMillan S., Holloway B., Mayers R., McCarthy D. and Williams G. (1991). Altered neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of obese (fa/fa) Zucker rats. Possible relationship to obesity and neuroendocrine disturbances. *Diabetes*, **40**: 1423-29.
168. McMahon L.R. and Wellman P.J. (1998). PVN infusion of GLP-1 (7-36)amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *Am J Physiol*, **274**: 1223-1229.

169. Meeran K., Os D., Edwards C.M., Turton M.D., Heath M.M., Gunn I. et al. (1999). Repeated intracerebroventricular administration of glucagons-like peptide-1 (7-36)amide or exendin (9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, **140**: 244-50.
170. Mei N. (1985). Intestinal chemiosensitivity. *Physiol Rev*, **65**: 211-237.
171. Meier J.J., Gallwitz B., Schmidt W.E. and Nauck M.A. (2002). Glucagon-like peptide-1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol*, **440**: 269-279.
172. Mercer J.G. and Speakman J.R. (2001). Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci Biobehav Rev*, **25(2)**: 101-116.
173. Merchenthaler I., Lopez F.J. and Negro-Vilar A. (1993). Anatomy and physiology of galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol*, **40**: 711-69.
174. Miyasaka K., Masuda M., Kanai S., Sato N., Kurosawa M. and Funakoshi A. (2002). Central Orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus. *Pancreas*, **25(4)**: 400-4.

175. Mizuno T.M., Kleopulos S.P., Bergen H.T., Roberts J.L., Priest C.A. and Mobbs C.V. (1997). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*, **47**: 294-297.
176. Mondal M.S., Nakazato M. and Matsukura S. (2002). Characterization of orexins (hypocretins) and melanin-concentrating hormone in genetically obese mice. *Regul Pept*, **104**: 21-5.
177. Monnikes H., Heymann-Monnikes I. and Take Y. (1992). CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioural profiles in rats. *Brain Res*, **574**: 70-76.
178. Morash B., Li A., Murphy P.R., Wilkinson M. and Ur E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, **140**: 5995-5998.
179. Mori K., Yoshimoto A., Takaya K., Hosoda K., Ariyasu H., Yahata K., Mukoyama M., Sugawara A., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K. and Nakao K. (2000). Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*, **486**: 213-216.
180. Moriguchi T., Sakurai T., Nambu T., Yanagisawa M. and Goto K (1999). Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced hypoglycaemia. *Neurosci Lett*, **264**: 101-4.

181. Morley J.E. and Levine A.S. (1982). Corticotrophin-releasing factor, grooming and ingestive behaviour. *Life Sci*, **31**: 1459-1464.
182. Morley J.E. (1990). Appetite regulation by gut peptides. *Ann Rev Nutr*, **10**: 383-395.
183. Morris B.J.(1989). Neuronal localization of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol*, **290**: 358-368.
184. Morton G.J., Blevins J.E., Williams D.L., Niswender K.D., Gelling R.W., Rhodes C.J., Baskin D.G. and Schwartz M. (2005). Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J Clin Invest*, **115(3)**: 703-710.
185. Morton N.M., Emilsson V., Liu Y-L. and Cawthorne M.A. (1998). Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem*, **273**: 26194-26201.
186. Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B. and Cone R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol*, **8**: 1298-1308.
187. Mouri T., Takahashi K., Kawauchi H., Sone M., Totsune K., Murakami O., Itoi K., Ohneda M., Sasano H. and Sasano N. (1993). Melanin-concentrating hormone in the human brain. *Peptides*, **14**: 643-646.

188. Moussa N.M. and Claycombe K.J. (1999). The yellow mouse obesity syndrome and mechanisms of agouti-induced obesity. *Obes Res*, **7**: 506-514.
189. Muccioli G., Tschop M., Papotti M., Deghenghi R., Heiman M. and Ghigo E. (2002). Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol*, **440**: 235-254.
190. Muruzabal F.J., Fruhbeck G., Gomez-Ambrosi J., Archanco M. and Burrell M.A. (2002). Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gen Comp Endocrinol*, **128(2)**: 149-52.
191. Naito N., Kawazoe I., Nakai Y. and Kawauchi H. (1988). Melanin-concentrating hormone-like immunoreactive material in the rat hypothalamus; characterization and subcellular localization. *Cell Tissue Res*, **253**: 291-5.
192. Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T. and Sasano H. (2003). Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol*, **205(1-2)**: 43-50.
193. Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. and Matsukura S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, **409**: 194-198.

194. Nambu T., Sakurai T., Mizukami K., Hosoya Y., Yanagisawa M. and Goto K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, **827**: 243-260.
195. Naslund E., Bogefors J., Skogar S., Gryback P. and Jacobsson H. (1999). Glucagon-like peptide-1 slows solid gastric emptying with inhibition of insulin, C-peptide, glucagons and peptide YY release in humans. *Am J Physiol*, **277**: R910-916.
196. Naslund E., Ehrstom M., Ma J., Hellstrom P.M. and Kirchgessner A.L. (2002). Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282(3)**: G470-9.
197. Nickel R., Schummer A. and Seiferle E. (1984). Trattato di Anatomia degli animali domestici- Anatomia degli Uccelli domestici, V volume. *Ed. CEA, Milano*.
198. Novin D., VanderWeele D.A. and Rezek M. (1973). Infusion of 2-deoxy-D-glucose into the epatic-portal system causes eating: evidence for peripheral glucoceptors. *Science*, **181**: 858-860.
199. Ohkubo T., Tanaka M. and Nakashima K. (2000). Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor mRNA. *Biochim Biophys Acta*, **1491**: 303-308.

200. Ohkubo T., Boswell T. and Lumineau S. (2002). Molecular cloning of chicken prepro-orexin cDNA and preferential expression in the chicken hypothalamus. *Biochim Biophys Acta*, **1577(3)**: 476-480.
201. Okumura H., Nagaya N., Enomoto M., Nakagawa E., Oya H. and Kangawa K. (2002). Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*, **39**: 779-783.
202. Ollmann M.M., Wilson B.D., Yang Y.K., Kerns J.A., Chen Y., Gantz I. and Barsh G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptor in vivo and in vitro by agouti-related protein. *Science*, **278**: 135-138.
203. Olson G.A., Olson R.D. and Kastin A.J. (1994). Endogenous opiates. *Peptides*, **15**: 1513-66.
204. Oomura Y. Ono T., Ooyama H. and Wayner M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*, **222**: 282-284.
205. Oomura Y. (1980). Input-output organization in the hypothalamus relating to food intake behaviour, in: P.J. Morgane, J. Panksepp (Eds.). *Handbook of the hypothalamus*, **2**: Physiology of the hypothalamus, Marcel Dekker, N.Y., 557-620.

206. Ørskov C. (1992). Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the enteroinsular axis. *Diabetologia*, **35**: 701-11.
207. Ouedrago R., Naslund E. and Kirchgessner A.L. (2003). Glucose regulates the release of orexin-A from the endocrine pancreas. *Diabetes*, **52(1)**: 111-7.
208. Parhar I.S., Sato H. and Sakuma Y. (2003). Ghrelin gene fish is modulated by sex and development. *Biochem Biophys Res Commun*, **305**: 169-175.
209. Peeters T.L. (2003). Central and peripheral mechanism by which ghrelin regulates gut motility. *J Physiol Pharmacol*, **54**: 95-103.
210. Pellemounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T. and Collins F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, **269**: 540-543.
211. Perrin M.H., Donaldson C.J., Chen R., Lewis K.A. and Vale W.W. (1993). Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*, **133**: 3058-3061.
212. Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G. and Kilduff T.S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, **18**: 9996-10015.

213. Picó C., Oliver P., Sánchez J. and Palou A. (2003). Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *Br J Nutr*, **90**: 735-741.
214. Plisetskaya E.M. and Mommsen T.P. (1996). Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. *Int Rev Cytol*, **168**: 187-257.
215. Powley T. (1977). The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety and cephalic phase hypothesis. *Psych Rev*, **84**: 89-126.
216. Pu S., Jain M.R., Kalra P.S. and Kalra S.P. (1998). Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept*, **78**: 133-136.
217. Qu D., Ludwig D.S., Gammeltoft S., Piper M., Pellemounter M.A., Cullen M.J., Mathes W.F., Przypek R., Kanarek R. and Maratos-Flier E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, **380**: 243-7.
218. Rawdon B.B. and Andrew A. (1999). Gut endocrine cells in birds: an overview, with particular reference to the chemistry of gut peptides and the distribution, ontogeny, embryonic origin and differentiation of the endocrine cells. *Prog Histochem Cytochem*, **34(1)**: 3-82.

219. Reynolds G.M., Ypung F.I., Williams A. and Rowlands D.C. (1994). Microwave- oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens. *Citopathology*, **5**: 345-358.
220. Richards M.P., Caperna T.J., Elsasser T.H., Ashwell C.M. and McMurtry J.P. (2000). Design and application of polyclonal peptide antiserum for the universal detection of leptin protein. *J Biochem Biophys Methods*, **45**: 147-56.
221. Ritzel R., Orskov C., Holst J.J. and Nauck M.A. (1995). Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1 (7-36)amide after subcutaneous injection in healthy volunteers: dose-response-relationships. *Diabetologia*, **38**: 720-725.
222. Roberge J.N. and Brubacker P.L. (1993). Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*, **133**: 233-240.
223. Rossetti L., Massillon D., Barzilai N., Vuguin P., Chen W., Hawkins M., Wu J. and Wang J. (1997). Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem*, **272**: 27758-63.
224. Rossi M., Kim M.S., Morgan D.G., Small C.J., Edwards C.M., Sunter D., Abusnana S., Goldstone A.P., Russell S.H.,

- Stanley S.A. et al. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, **139**: 4428-4431.
225. Russell S.H., Kim M.S., Small C.J., Abbott C.R., Morgan D.G., Taheri S., Murphy K.G., Todd J.F., Ghatei M.A. and Bloom S.R. (2000). Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol*, **12(12)**: 1213-8.
226. Sahu A. (1998). Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y are targets of leptin signalling in the hypothalamus. *Endocrinology*, **139**: 795-798.
227. Sahu A. (2002). Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-1 (orexin-A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain Res*, **944**: 232-8.
228. Sakata I., Nakamura K., Yamakazi M., Matsubara M., Hayashi Y., Kangawa K. and Sakai T. (2002). Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*, **23**: 531-536.

229. Sakata I., Mori T., Kaiya H., Yamazaki M., Kangawa K., Inoue K. and Sakai T. (2004). Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zoolog Sci*, **21**: 757-762.
230. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Rickson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R.S., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.-S., Terret J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J. and Yanagisawa M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell*, **92**: 573-585.
231. Sakurai T. (1999). Orexins and orexin receptors: implication in feeding behaviour. *Regul Pept*, **85**: 25-30.
232. Saladin R., De-Vos P., Guerre-Millo M. and Leturge A. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, **377**: 527-529.
233. Samson W.K., Gosnell B., Chang J.K., Resch Z.T. and Murphy T.C. (1999). Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res*, **831**: 248-253.
234. Sawchenko P.E. (1998). Toward a new neurobiology of energy balance, appetite and obesity: The anatomists weigh in. *J Comp Neurol*, **402**: 435-41.

235. Schaffhauser A.O., Stricker Krongad A., Brunner L., Cumin F., Gerald C., Whitebread S., Criscione L. and Hofbauer K.G. (1997). Inhibition of food-intake by neuropeptide YY5 receptor antisense oligonucleotides. *Diabetes*, **46**: 1792-1798.
236. Schwartz M.W., Seeley R.J., Campfield L.A., Burn P. and Baskin D.G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*, **98**: 1101-1106.
237. Schwartz M.W., Seeley R.J., Weigle D.S., Campfield L.A., Burn P. and Baskin D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, **46**: 2119-2123.
238. Schwartz M.W., Baskin D.G., Kaiyala K.J. and Woods S.C. (1999). Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr*, **69(4)**: 584-96.
239. Schwartz M.W., Woods S.C., Porte J.r.D., Seeley R.J and Baskin D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**: 661-671.
240. Scrocchi L.A., Brown T.J., MacLusky N., Brubaker P.L., Auerbach A.B., Joyner A.L. and Drucker D.J. (1996). Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagons-like peptide receptor gene. *Nature Med*, **2**: 1254-1258.

241. Scrocchi L.A., Hill M.E., Saleh J., Perkins B. and Drucker D.J. (2000). Elimination of GLP-1R signalling does not modify weight gain and islet adaptation in mice with combined disruption of leptin and GLP-1 action. *Diabetes*, **49**: 1552-1560.
242. Seoane L.M., Tovar S.A., Perez D., Mallo F., Lopez M., Senaris R., Casanueva F.F. and Dieguez C. (2004). Orexin-A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol*, **150(5)**: 731-6.
243. Sergeyev V., Broberger C., Gorbatyuk O. and Hokfelt T. (2000). Effect of 2-mercaptoacetate and 2-deoxy-D-glucose administration on the expression of NPY, AgRP, POMC, MCH and hypocretin/orexin in the rat hypothalamus. *Neuroreport*, **11**: 117-121.
244. Shibahara M., Sakurai T., Nambu T., Takenouchi T., Iwaasa H., Egashira S.I., Ihara M. and Goto K. (1999). Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides*, **20**: 1169-1176.
245. Silverstein J.T., Bondareva V.M., Leonard J.B. and Plisetskaya E.M. (2001). Neuropeptide regulation of feeding in catfish, *Ictalurus punctatus*: a role for glucagons-like peptide-1 (GLP-1)? *Comp Biochem Physiol B*, **129**: 623-631.

246. Simansky K.J. (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*, **73**: 37-42.
247. Sliker L.J., Sloop K.W., Surface P.L., Kriaucinaus A. and LaQuier F. (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*, **271**: 5301-5304.
248. Small C.J., Kim M.S., Stanley S.A., Mitchell J.R., Murphy K., Morgan D.G., Ghatei M.A. and Bloom S.R. (2001). Effects of chronic central nervous system administration of Agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes*, **50**: 248-254.
249. Smart D. and Jerman J.C. (2002). The physiology and pharmacology of the orexins. *Pharmacol Ther*, **94**: 51-61.
250. Smith B.K., York D.A. and Bray G.A. (1994). Chronic cerebroventricular galanin does not induce sustained hyperphagia or obesity. *Peptides*, **14**: 1267-72.
251. Smith S.L., Harrold J.A. and Williams G. (2002). Diet-induced obesity increases μ opioid receptor binding in specific regions of the rat brain. *Brain Res*, **953**: 215-222.
252. Smith-Kirwin S.M., O'Connor D.M., De Johnston J., Lancey E.D., Hassink S.G. and Funanage V.L. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**: 1810-1813.

253. Sobhani I., Bado A., Vissuzaine C., Buyse M., Kermorgant S., Laigneau J.P., Attoub S., Lehy T., Henin D., Mignon N. and Lewin M.J. (2000). Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*, **47**: 178-183.
254. Solcia E., Rindi G., Buffa R., Fiocca R. and Capella C. (2000). Gastric endocrine cells: types, function and growth. *Regul Pept*, **93**: 31-35.
255. Stanley B.G., Kyrkouli S.E., Lampert S. and Leibowitz S.F. (1986). Neuropeptide Y cronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, **7**: 1189-1192.
256. Steinberg G.R., Smith A.C., Wormald S., Malenfant P., Collier C. and Dick D.J. (2004). Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**: E57-E63.
257. Stellar E. (1994). The physiology of motivation. 1954. *Psychol Rev*, **101(2)**: 301-311.
258. Sternberger L.A. (1986). *John Wiley & Sons*, New York.
259. Strobel A., Issad T., Camoin L., Ozata M. and Strosberg A.D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*, **18**: 213-215.

260. Sutcliffe J.G. and de Lecea L. (2000). The hypocretins: excitatory neuromodulatory peptides for multiple homeostatic system, including sleep and feeding. *J Neurosci*, **62**: 161-168.
261. Takahashi N., Okumura T., Yamada H. and Kohgo Y. (1999). Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**: 623-627.
262. Tannenbaum G.S., Gurd W. and Lapointe M. (1998). Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. *Endocrinology*, **139**: 3871-3875.
263. Taouis M., Chen J.W., Daviaud C., Dupont J., Derouet M. and Simon J. (1998). Cloning the chicken leptin gene. *Gene*, **208**: 239-242.
264. Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T. and Deeds J. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell*, **83**: 1263-1271.
265. Tartaglia L.A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem*, **272**: 6093-6096.
266. Tatemoto K. (1982). Neuropeptide Y: complete aminoacid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci*, **79**: 5485-5489.

267. Thim L., Kristensen P. Larsen P.J. and Wulff B.S. (1998). CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol*, **30**: 1281-1284.
268. Thompson D.G. (2000). GLP-1 and the gut. *Gut*, **46**: 591-594.
269. Trivedi P., Yu H., MacNeil., D.J., van der Ploeg L.H.T. and Guan X.-M. (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*, **438**: 71-75.
270. Tschöp M., Smiley D., and Heiman M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**: 908-913.
271. Tschöp M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R. and Folwaczny C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, **24**: RC19-RC21.
272. Turton M.D., O'Shea D., Gunn I., Beak S.A., Edwards C.M. Meeran K., Choi S.J., Taylor G.M., Heath M.M., Lambert P.D., Wilding J.P., Smith D.M., Ghatei M.A., Herbert J. and Bloom S.R. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, **379**: 69-72.
273. Uniappan S., Lin X., Cervini L., Rivier J., Kaya H., Kangawa K. and Peter R.E. (2002). Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid,

- partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*, **143(10)**: 4143-4146.
274. Vale W., Spiess J., Rivier C. and Rivier J. (1981). Characterization of 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. *Science*, **213**: 1394-1397.
275. Valverde I., Merida E., Delgado E., Trapote M.A. and Villanueva-Penacarrillo M.C. (1993). Presence and characterization of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology*, **132**: 75-9.
276. van der Lely A.J., Tschop M., Heiman M.L. and Ghigo E. (2005). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Rev*, **25(3)**: 426-457.
277. Vaughan J.M., Fisher W.H., Hoeger C., Rivier J. and Vale V. (1989). Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology*, **125**: 1660-1665.
278. Vial J.D. and Garrido J. (1979). Comparative cytology of hydrochloric acid secreting cells. *Arch Biol Med Exp*, **12**: 39-48.
279. Volante M., Allia E., Gugliotta P., Funaro A., Broglio F., Deghenghi R., Muccioli G., Ghigo E. and Papotti M. (2002).

- Expression of ghrelin and of GHS receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, **279**: E695-E706.
280. Volkoff H., Bjorklund J.M. and Peter R.E. (1999). Stimulation of feeding behaviour and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Res*, **846**: 204-209.
281. Volkoff H. and Peter R.E. (2001a). Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology*, **142**: 5076-5088.
282. Volkoff H. and Peter R.E. (2001b). Interaction between orexin-A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regul Pept*, **101**: 59-72.
283. Volkoff H., Eykelbosh A.J. and Peter R.E. (2003). Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin-A, and modulation by fasting. *Brain Res*, **972**: 90-109.
284. Vrang N., Tang-Christensen M., Larsen P.J. and Kristensen P. (1999). Recombinant CART peptide induces c-Fos

- expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res*, **818**: 499-509.
285. Wada R., Sakata I., Kaiya H., Nakamura K., Hayashi Y., Kangawa K. and Sakai T. (2003). Existence of ghrelin-immunopositive and -expressing cells in the proventriculus of the hatching and adult chicken. *Regul Pept*, **111**: 123-128.
286. Wang Q., Bing C., Al B.K., Mossakowaska D.E., Wang X.M., McBay D.L., Neville W.A., Taddayon M., Pickavance L., Dryden S., Thomas M.E., McHale M.T., Gloyer I.S., Wilson S., Buckingham R., Arch J.R, Trayhurn P. and Williams G. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes*, **46**: 335-341.
287. Wang J., Liu R., Hawkins M., Barzilai N. and Rossetti L. (1998). A nutrient-sensing pathways regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, **393**: 684-688.
288. Wettergren A., Schjoldager B., Mortensen P.E., Myhre J., Christiansen J. Holst J.J. (1993). Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dig Sci*, **38**: 665-673.
289. Wettergren A., Wojdemann M., Meisner S., Stadil F. and Holst J.J. (1997). The inhibitory effect of glucagon-like peptide-

- 1 (GLP-1) 7-36amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut*, **40**: 597-601.
290. Wilding J.P.H., Gilbey S.G., Bailey C.J., Batt R.A.L., Williams G., Ghatei M.A. and Bloom S.R. (1993). Increased neuropeptide Y messenger RNA and decreased neurotensin messenger RNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, **132**: 1939-1944.
291. Williams C.M., Rogers P.J. and Kirkham T.C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta 9-THC. *Physiol Behav*, **15**: 343-346.
292. Williams C.M. and Kirkham T.C. (1999). Anandamide induces over-eating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, **143**: 315-317.
293. Williams G., Bing C., Cai X.J., Harrold J.A., King P.J. and Liu X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*, **74**: 683-701.
294. Woods S.C., Seeley R.J., Porte D.Jr. and Schwartz M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, **280**: 1378-1383.
295. Wren A.M., Small C.J., Ward H.L., Murphy K.G., Dakin C.L., Taheri S., Kennedy A.R., Roberts G.H., Morgan D.C.A., Ghatei M.A. and Bloom S.R. (2000). The novel hypothalamic

- peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, **141**: 4325-4328.
296. Yamamoto Y., Ueta Y., Date Y., Nakazato M., Hara Y., Serino R., Nomura M., Shibuya I., Matsukura S. and Yamashita H. (1999). Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res*, **65**: 14-22.
297. Yamanaka A., Kunii K., Nambu T., Tsujino N., Sakai A., Matsuzaki I., Miwa Y., Goto K. and Sakurai T. (2000). Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res*, **859**: 404-9.
298. Yeung C.M. and Chow B.K. (2001). Identification of a proglucagon cDNA from *Rana tigrina rugulosa* that encodes two GLP-1 and that is alternatively spliced in a tissue-specific manner. *Gen Comp Endocrinol*, **124**: 144-151.
299. Yeung C.M., Mojsov S., Mok P.Y. and Chow B.K. (2002). Isolation and structure-function studies of a glucagon-like peptide 1 receptor from goldfish *Carassius auratus*: identification of three charged residues in extracellular domains critical for receptor function. *Endocrinology*, **143(12)**: 4646-54.

300. Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Karanth S. and McCann S.M. (1997). Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 1023-1028.
301. Zhang F., Basinski M. B., Beals J.M., Briggs S.L., Churgay L.M, Clawson D.K., DiMarchi R.D., Furman T.C., Hale J.E. et al. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, **387**: 206-209.
302. Zhang Y. Proenca R., Maffei R., Barone M., Leopold L. and Friedman J. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human omologue. *Nature*, **372**: 425-432.
303. Zhang W., Chen M., Chen X., Segura B.J. and Mullholland M.W. (2001). Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in rat. *J Physiol*, **537**: 231-236.
304. Zheng H., Corkern M.M, Crousillac S.M., Patterson L.M., Phifer C.B. and Berthoud H.R. (2002). Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **282**: R1773-81.

RINGRAZIAMENTI

Un **GRAZIE** estremamente sincero ed affettuoso alla Prof.ssa Giuliana Gargiulo ed al Prof. Paolo de Girolamo, prodighi di consigli di fondamentale importanza per la mia crescita umana e professionale.

GRAZIE di cuore a tutto il personale, strutturato e non, del Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche per aver condiviso con me questa indimenticabile esperienza e per avermi aiutato, con tanta pazienza, a raggiungere questo importante obiettivo. **GRAZIE**, in particolare, a Michelino ed Annamaria per essermi stati vicino sempre, in tutte le difficoltà incontrate, al pari di due veri genitori!