



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA TRASLAZIONALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE

SEZIONE DI ANATOMIA UMANA ED ISTOLOGIA

Roberta Passanisi

**VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA E MOLECOLARE DEI LIVELLI DI
GRELINA NELLO STOMACO DEI SOGGETTI OBESI**

TESI DI DOTTORATO

Relatore: Chiar.mo Prof. Sergio Castorina
Tutor: Dott.ssa Luca Tonia

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

1. ABSTRACT.....	2
2. INTRODUZIONE.....	1
2.1 - Definizione ed epidemiologia dell'obesità	2
2.2 - Eziopatogenesi dell'obesità	6
2.3 Patologie associate con obesità	9
2.4 Anatomia dello stomaco	12
2.5 Trattamento Medico	16
2.6 Trattamento chirurgico	19
2.6.1 Chirurgia Bariatrica	19
2.6.2 Sleeve Gastrectomy	21
2.7 La Grelina	24
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 Procedura chirurgica.....	30
3.2 Immunoistochimica	31
3.2.1 <i>Microscopia ottica e analisi morfometrica</i>	32
3.3 Preparazione dei campioni anatomici per l'analisi molecolare	33
3.4 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA	34
3.5 RT-PCR Quantitativa (qRT-PCR).....	34
3.6 Microscopia Elettronica.....	36
3.7 Analisi Statistica.....	38
4. RISULTATI	39
4.1 Studio della morfologia delle ghiandole del fondo gastrico.....	41
4.2 Livelli di espressione della proteina grelina e del suo mRNA	42
4.2 Analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione	48
4.3 Grado d'innervazione del fondo dello stomaco.....	49
5. DISCUSSIONE.....	51
6. CONCLUSIONI.....	54
7. BIBLIOGRAFIA.....	55

1. ABSTRACT

Background: è stato evidenziato che dopo sleeve gastrectomy la concentrazione della grelina, che può influenzare il peso corporeo modulando l'appetito, diminuisca. Altri lavori hanno esaminato l'espressione della grelina nello stomaco, tuttavia lo scopo del presente studio era quello di valutare la distribuzione delle cellule che producono l'ormone grelina nel fondo dello stomaco nei pazienti obesi confrontandola con i controlli sani e, in maniera innovativa, studiare inoltre il grado di innervazione in modo tale da avere un quadro completo della condizione dello stomaco in pazienti affetti da obesità severa.

Metodi: sono stati candidati allo studio in totale 36 pazienti, di cui 21 pazienti obesi sottoposti a sleeve gastrectomy laparoscopica (LSG) per obesità grave e 15 sani. Il numero di cellule grelina-positive (GPCs) è stato contato mediante immunoistochimica del fondo della mucosa gastrica. È stata misurata anche l'espressione dell'mRNA della grelina. Abbiamo analizzato i livelli del trascritto della grelina estraendo l'RNA totale dalla mucosa del fondo gastrico. Abbiamo anche studiato la morfologia delle cellule endocrine grelina-positive al microscopio elettronico (TEM). Parallelamente è stato valutato, con tecniche d'immunoistochimica, il grado d'innervazione dello stomaco dei pazienti obesi e dei controlli sani.

Risultati: l'espressione della grelina nel fondo gastrico dei pazienti obesi è risultata legata al sesso, con livelli superiori nelle donne rispetto agli uomini (53,4 % vs 44,8 %). Il numero dei GPC non era significativamente maggiore nei pazienti obesi rispetto ai controlli non-obesi ($p > 0,05$). Rispetto ai controlli i livelli di espressione del trascritto grelina sono aumentati in due pazienti diabetici e in tre pazienti normoglicemici, ciò pone le basi per ipotizzare la presenza di più sottotipi di pazienti obesi con espressione variabile di grelina. All'analisi al ME in condizioni di obesità non risulta modificata la morfologia della ghiandola endocrina grelina-positiva. Infine, attraverso una valutazione morfometrica e quantitativa delle fibre nervose abbiamo mostrato un'aumentata densità di nervi nello stomaco dei pazienti obesi rispetto ai controlli, indipendentemente dai livelli di glicemia.

Conclusioni: I risultati che abbiamo ottenuto ci hanno permesso di avere una conoscenza più approfondita della morfologia del fondo gastrico dei soggetti obesi; è stato infatti effettuato uno studio valutando parallelamente i livelli di grelina sia da un punto di vista istologico che molecolare; è stata inoltre analizzata l'ultrastruttura della cellula grelina-positiva. Sebbene lo studio abbia diverse limitazioni come la piccola popolazione analizzata e la mancanza di un adeguato periodo di follow-up, i risultati sono interessanti e possono costituire uno spunto per ricerche future con una coorte di campioni più ampia.

2. INTRODUZIONE

Sulla base dei dati riportati in letteratura riguardanti l'obesità e il ruolo della grelina nello stomaco, ci siamo proposti di studiare la morfologia delle ghiandole del fondo gastrico nei pazienti obesi sottoposti ad intervento laparoscopico di sleeve gastrectomy (LSG). Ciò ha rappresentato una premessa per approfondire i seguenti aspetti:

- Valutazione della distribuzione e del numero di cellule endocrine, con particolare riferimento a quelle che esprimono grelina, al fine di attribuire un significato clinico ai livelli di tale ormone.
- Studiare i livelli del mRNA della grelina.
- Analizzare la correlazione tra i livelli di mRNA e di proteina.
- Valutare la morfologia delle cellule grelina-positiva al microscopio elettronico.
- Studiare il grado d'innervazione del fondo dello stomaco dei soggetti obesi sottoposti a sleeve gastrectomy, rispetto a quello di soggetti sani con l'obiettivo di valutare una possibile compromissione dell'innervazione della mucosa gastrica.

2.1 - Definizione ed epidemiologia dell'obesità

L'obesità è una grave realtà cui la sanità pubblica deve far fronte, in particolare negli Stati Uniti e in tutti i Paesi industrializzati, con una prevalenza che aumenta rapidamente in numerose nazioni.¹ Nel biennio 2009-2010 la prevalenza dell'obesità tra uomini e donne in USA è stata quasi del 36% (Fig.1).² La prevalenza sta aumentando rapidamente in numerose nazioni industrializzate in tutto il mondo.

Secondo i dati Istat in Italia, nel 2015, più di un terzo della popolazione adulta (35,3%) è in sovrappeso, mentre una persona su dieci è obesa (9,8%); complessivamente, il 45,1% dei soggetti di età ≥ 18 anni è in eccesso ponderale³.

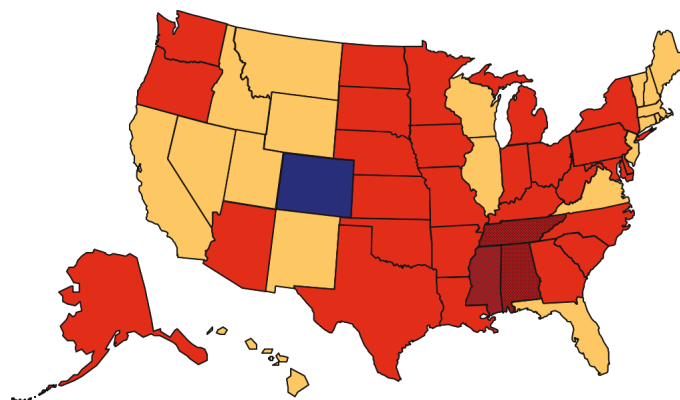


Figura 1: prevalenza dell'obesità in USA.

Questo tasso di crescita rappresenta una vera e propria pandemia che richiede un'attenzione urgente, basti pensare al potenziale peso dell'obesità sulla morbilità, sulla mortalità e sull'economia. Il costo annuale della gestione dell'obesità negli Stati Uniti è di circa 190,2 miliardi di dollari all'anno, ovvero il 20,6% delle spese sanitarie nazionali⁴. Rispetto a un soggetto non obeso, un obeso incide 2741 dollari in più sui costi medici ogni anno. La prevalenza dell'obesità in tutto il mondo è in aumento, in

¹ Roundtable on Obesity Solutions, Food and Nutrition Board, Health and Medicine Division, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Obesity in the Early Childhood Years: State of the Science and Implementation of Promising Solutions: Workshop Summary. 2016 May 23.

² Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. 2012 Feb 1. 307(5):491-7.

³ www.istat.it

⁴ Cawley J, Meyerhoefer C. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. *J Health Econ*. 2012 Jan. 31(1):219-30.

particolare nelle nazioni industrializzate dell'emisfero settentrionale, come gli Stati Uniti, il Canada e la maggior parte dei paesi europei. I dati disponibili dal monitoraggio multinazionale delle tendenze e dei determinanti nel caso della malattia cardiovascolare (MONICA) suggeriscono che almeno il 15% degli uomini e il 22% delle donne in Europa sono obesi (Fig.2).⁵

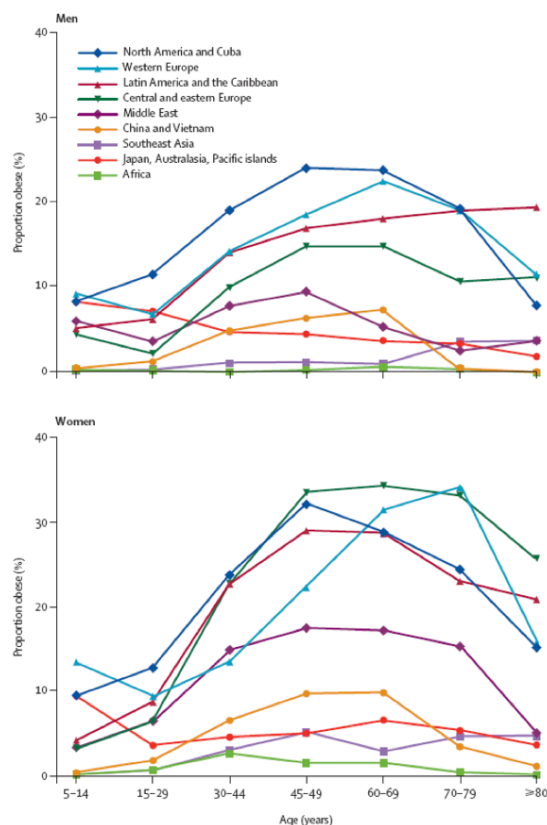


Figura 2: Gradi di obesità nei Paesi.

Sebbene esistano diverse classificazioni e definizioni per i gradi di obesità, le classificazioni più ampiamente accettate sono quelle dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), basate sull'indice di massa corporea (BMI - Body Mass Index o Indice di Massa Corporea, ottenibile dal rapporto peso/altezza al quadrato – kg/m^2). Le denominazioni dell'OMS sono le seguenti:

- Grado 1 (sovrappeso)- BMI di 25-29,9 kg/m^2
- Grado 2 (obesità) - BMI di 30-39,9 kg/m^2
- Grado 3 (obesità grave) - BMI ≥ 40 kg/m^2

⁵ Molarius A, Seidell JC, Sans S, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Varying sensitivity of waist action levels to identify subjects with overweight or obesity in 19 populations of the WHO MONICA Project. *J Clin Epidemiol.* 1999 Dec. 52(12):1213-24

Alcuni autori prediligono una definizione di obesità basata sulla percentuale di grasso corporeo:

- Uomini: percentuale di grasso corporeo superiore al 25% (21-25%)
- Donne: percentuale di grasso corporeo superiore al 33%, (31-33%)

L'indice di massa corporea (BMI), noto anche come indice Quetelet, viene utilizzato in modo molto più comune rispetto alla percentuale di grasso corporeo per definire l'obesità. La percentuale di grasso corporeo può essere stimata indirettamente utilizzando l'equazione Deurenberg, come segue:
percentuale di grasso corporeo = $1,2 (\text{BMI}) + 0,23 (\text{età}) - 10,8 (\text{sex}) - 5,4$.⁶

Altri indici utilizzati per stimare il grado e la distribuzione dell'obesità includono i 4 spessori standard della pelle e varie misure antropometriche, delle quali le circonferenze della vita e dell'anca sono le più importanti. Le misure di skinfold sono i mezzi meno accurati per valutare l'obesità. La scansione radiografica di assorbimento a doppia energia (DXA) viene utilizzata principalmente dai ricercatori per misurare con precisione la composizione corporea, in particolare la massa grassa. Ha l'ulteriore vantaggio di misurare la distribuzione regionale del grasso.⁷

I dati provenienti da varie banche dati e grandi coorti prospettiche, come i risultati degli studi Framingham e NHANES, indicano chiaramente che l'obesità è associata ad un notevole aumento dei tassi di morbidità e mortalità. Le conseguenze negative dell'obesità possono essere attribuite in parte alle comorbidità, ma numerosi studi osservazionali dettagliati dal gruppo di esperti sull'identificazione, la valutazione e il trattamento degli adulti in sovrappeso, nonché i risultati delle relazioni di Allison, Bray e altri, mostrano esaurientemente che l'obesità da sola è associata a una maggiore morbidità e mortalità cardiovascolare e una maggiore mortalità per tutte le cause.⁸

Per una persona con un BMI di $25-28,9 \text{ kg} / \text{m}^2$, il rischio relativo per la malattia coronarica è 1,72.

Il rischio aumenta progressivamente con un BMI crescente; con BMI superiore a $33 \text{ kg} / \text{m}^2$, il rischio

⁶ Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. JAMA. 1999 Oct 27. 282(16):1530-8.

⁷ Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight Adults. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. Am J Clin Nutr. 1998 Oct. 68(4):899-917.

⁸ Bray GA. Health hazards of obesity. Endocrinol Metab Clin North Am. 1996 Dec. 25(4):907-19.

relativo è di 3,44. Trend simili sono stati dimostrate nel rapporto tra obesità e ictus o insufficienza cardiaca cronica.

Per le persone con obesità grave ($BMI \geq 40$), l'aspettativa di vita è ridotta di 20 anni negli uomini e di circa 5 anni nelle donne. La maggiore riduzione dell'aspettativa di vita per gli uomini è coerente con l'aumento della prevalenza dell'obesità androgena (ossia prevalentemente addominale) e del grasso corporeo in percentuale biologicamente superiore alle donne. Il rischio di mortalità precoce è ancora maggiore nei soggetti obesi che fumano. I dati di mortalità sembrano avere una conformazione a U o J in relazione alla distribuzione del peso. I fattori che modulano la morbidità e la mortalità associati all'obesità sono i seguenti:

- Età dell'insorgenza e durata dell'obesità
- Severità dell'obesità
- Quantità di adiposità centrale
- Le comorbidità
- Genere
- Livello di fitness cardiorespiratorio
- Esercizio fisico⁹

⁹ Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. JAMA. 2005 Apr 20. 293(15):1861-7.

2.2 - Eziopatogenesi dell'obesità

L'adipocita, che è la base cellulare dell'obesità, può essere aumentato di dimensioni o di numero nelle persone obese. L'obesità ipertrofica, caratterizzata da cellule adipose allargate, è tipica dell'obesità addominale androide. L'obesità ipercellulare è più variabile dell'obesità ipertrofica, si verifica in genere nelle persone che sviluppano l'obesità nell'infanzia o nell'adolescenza, ma è anche presente nei soggetti con obesità severa. L'obesità ipertrofica di solito inizia in età adulta, è associata ad un aumento del rischio cardiovascolare e risponde rapidamente alle misure di riduzione del peso. Al contrario, i pazienti con obesità ipercellulare possono trovare difficoltà a perdere peso mediante interventi non chirurgici.¹⁰

L'adipocita è una cellula complessa e metabolicamente attiva. Attualmente, l'adipocita è percepito come una ghiandola endocrina attiva che produce diversi peptidi e metaboliti che possono essere rilevanti per il controllo del peso corporeo, che vengono studiati intensamente. Tuttavia, la funzione di molte di queste citochine identificate rimane sconosciuta o poco chiara. I prodotti proinfiammatori dell'adipocita includono:¹¹

- TNF alfa
- Interleuchina 6
- MCP-1
- Lipotransina
- Inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1) (Associato al rischio cardiovascolare)
- Proteina adipocitaria del legame lipidico
- Proteina di stimolazione dell'acile
- Prostaglandine
- Leptina (regolatore di appetito)

¹⁰ Martinelli CE, Keogh JM, Greenfield JR, Henning E, van der Klaauw AA, Blackwood A, et al. Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jan. 96(1):E181-8.

¹¹ Hamdy O. The role of adipose tissue as an endocrine gland. *Curr Diab Rep.* 2005 Oct. 5(5):317-9.

- Adiponectina (ruolo importante nella sensibilità all'insulina)

L'eziologia dell'obesità è molto più complessa del semplice squilibrio tra l'assunzione di energia e la produzione di energia. Anche se questa concezione consente una facile concettualizzazione dei vari meccanismi coinvolti nello sviluppo dell'obesità, i fattori possibili per lo sviluppo dell'obesità sono i seguenti:

- Fattori metabolici
- Fattori genetici
- Livello di attività
- Fattori endocrini
- Razza, sesso ed età
- Fattori etnici e culturali
- Stato socioeconomico
- Abitudini alimentari
- Fumo
- Gravidanza e menopausa
- Fattori psicologici
- Storia di diabete gestazionale
- Storia di allattamento materno

Tuttavia, la prevalenza di scarsa attività fisica nei paesi industrializzati è notevole e rilevante per l'aumento dell'obesità.¹² L'obesità è la risultante della combinazione variabile di due elementi: la suscettibilità genetica, cioè di una predisposizione genetica dell'individuo a diventare obeso, e la presenza di fattori ambientali.

Due principali gruppi di fattori, genetici e ambientali, hanno un equilibrio che varia in modo evolutivo nello sviluppo dell'obesità. Si presume che i fattori genetici spieghino il 40-70% della varianza

¹² Physical Activity: Facts about Physical Activity. Centers for Disease Control and Prevention. January 9, 2013.

nell'obesità, entro un limite di BMI definito ($18-30 \text{ kg / m}^2$). Uno studio su gemelli monozigoti, nutriti con diverse kcal al giorno, 6 giorni alla settimana, durante un periodo di 100 giorni, ha rilevato che la quantità di aumento di peso varia significativamente tra le coppie (da 4,3 a 13,3 kg). Tuttavia, la somiglianza all'interno di ciascuna coppia era significativa rispetto al peso corporeo, alla percentuale di massa grassa, alla massa grassa e al grasso sottocutaneo stimato, con circa 3 volte più varianza fra le coppie che all'interno di esse.¹³ Questa osservazione indica che fattori genetici sono significativamente coinvolti e possono governare la tendenza a memorizzare l'energia. La forte ereditarietà dell'obesità è stata dimostrata in diversi studi su gemelli e soggetti adottati, in cui gli individui obesi che sono stati allevati separatamente hanno seguito lo stesso pattern di peso di quello dei loro genitori biologici e del loro gemello identico. Il tasso metabolico, l'attività fisica spontanea e la risposta termica al cibo sembrano essere ereditabili in misura variabile. Uno studio di Freeman e coll.¹⁴ ha rilevato che avere un padre in sovrappeso o obeso e una madre sana aumenta significativamente le probabilità di obesità infantile, tuttavia, una madre obesa e un padre sano non era associato ad un aumento del rischio di obesità nell'infanzia. Questa discrepanza suggerisce un ruolo per i fattori epigenetici nel rischio ereditario.

¹³ Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990 May 24. 322(21):1477-82.

¹⁴ Freeman E, Fletcher R, Collins CE, et al. Preventing and treating childhood obesity: time to target fathers. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Jan. 36(1):12-5.

2.3 Patologie associate con obesità

L'obesità è associata a una serie di potenziali comorbidità che aumentano significativamente il rischio di morbidità e mortalità nei soggetti obesi. Sebbene non sia stato chiaramente dimostrato alcun rapporto causale ed effettivo per tutte queste comorbidità, la valutazione di queste condizioni dopo una notevole perdita di peso suggerisce che l'obesità probabilmente svolge un ruolo importante nel loro sviluppo. Oltre alla massa totale dei grassi corporei, sono stati associati i seguenti aspetti dell'obesità:

- Distribuzione del grasso
- Girovita
- Età
- Pressione intra-addominale
- Distribuzione del grasso

I dati accumulati suggeriscono che la distribuzione regionale di grassi influenza sostanzialmente l'incidenza di comorbidità associata all'obesità. L'obesità androide, in cui l'adiposità è prevalentemente addominale (viscerale e, in misura minore, sottocutanea), è fortemente correlata con le conseguenze metaboliche e cliniche dell'obesità.

Nella definizione della sindrome metabolica¹⁵ si evidenzia che esiste un rischio cardiovascolare (obesità metabolica centrale) significativamente maggiore in uomini con circonferenze di vita superiori a 94 cm e in donne con circonferenze di vita di oltre 80 cm, così come i rapporti tra vita-anca superiore a 0,95 negli uomini e superiore a 0,8 nelle donne. Circonferenze di 102 cm negli uomini e 88 centimetri nelle donne indicano un rischio notevolmente aumentato che richiede un intervento terapeutico urgente. Queste soglie sono molto inferiori nelle popolazioni asiatiche.¹⁶

¹⁵ Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27. 109(3):433-8.

¹⁶ Tan CE, Ma S, Wai D, Chew SK, Tai ES. Can we apply the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel definition of the metabolic syndrome to Asians ?. *Diabetes Care*. 2004 May. 27(5):1182-6.

Un BMI elevato durante l'adolescenza (che parte dall'intervallo attualmente considerato normale) è fortemente associato al rischio di sviluppare disturbi legati all'obesità più tardi nella vita, indipendente dal BMI da adulto. Gli aumenti di BMI durante l'età giovanile (25-40 anni) sono associati a un peggior profilo di biomarcatori correlati all'obesità rispetto a quelli aumentati del BMI durante l'età adulta. Ciò è coerente con la maggior parte dei dati emergenti relativi alla tempistica dei cambiamenti nel BMI e successive conseguenze sulla salute.¹⁷

Oltre alle complicanze metaboliche associate all'obesità, è stato riconosciuto un paradigma di aumento della pressione intra-addominale. Questo effetto di pressione è più evidente nell'impostazione di obesità marcata ($\text{BMI} \geq 50 \text{ kg / m}^2$) ed è esposta dai chirurghi bariatrici. I risultati della chirurgia bariatrica e dei modelli animali suggeriscono che questa elevazione di pressione può avere un ruolo (potenzialmente importante) nella patogenesi delle comorbidità dell'obesità quali: pseudotumor cerebri, stasi circolatoria degli arti inferiori, ulcere, dermatite, tromboflebite, reflusso esofageo, ernie addominali, ipertensione e sindrome nefrotica.¹⁸

I soggetti in sovrappeso e obesi hanno un rischio maggiore di sviluppare le seguenti condizioni:¹⁹

- Sindrome metabolica
- Diabete di tipo 2
- Ipertensione
- Dislipidemia
- Malattia coronarica
- Osteoartrite
- Ictus
- Depressione
- Malattia epatica non alcolica (NAFLD)

¹⁷ Montonen J, Boeing H, Schleicher E, Fritsche A, Pischon T. Association of changes in body mass index during earlier adulthood and later adulthood with circulating obesity biomarker concentrations in middle-aged men and women. *Diabetologia*. 2011 Jul. 54(7):1676-83.

¹⁸ Sugerman HJ. Effects of increased intra-abdominal pressure in severe obesity. *Surg Clin North Am*. 2001 Oct. 81(5):1063-75, vi.

¹⁹ Hackethal V. Obese women may have 25% increased risk for stillbirth. *Medscape Medical News*. March 27, 2014.

- Infertilità (donne) e disfunzione erettile (uomini)
- Malattie della cistifellea
- Apnea ostruttiva del sonno
- Malattia da reflusso gastroesofageo (GERD)
- Alcuni tumori (es. endometriali, mammella e colon)
- Asma

Uno studio ha indicato che non solo la gravità dell'obesità, ma anche la sua durata è associata al rischio dell'individuo di sviluppare il diabete mellito di tipo 2. Sulla base di un lungo follow-up di 5132 partecipanti allo Studio di Framingham Offspring, gli investigatori hanno trovato un aumento significativo nel rischio di diabete di tipo 2.²⁰

²⁰ Abdullah A, Amin FA, Hanum F, et al. Estimating the risk of type-2 diabetes using obese-years in a contemporary population of the Framingham Study. *Glob Health Action*. 2016. 9:30421.

2.4 Anatomia dello stomaco

Lo stomaco è la prima parte intra-addominale del tratto gastrointestinale (GI) o digestivo. È un organo a forma di sacco e può assumere diverse forme, a seconda della costituzione e della postura del soggetto e dello stato di pienezza dell'organo. Lo stomaco si trova nel quadrante superiore destro dell'addome. L'esofago toracico entra nell'addome attraverso lo iato esofageo del diaframma al livello di T10. La porzione addominale dell'esofago ha una breve lunghezza intra-addominale (2-3 cm). La giunzione esofagogastrica (cardias), quindi, si trova nell'addome sotto il diaframma a sinistra della linea mediana a livello T11.

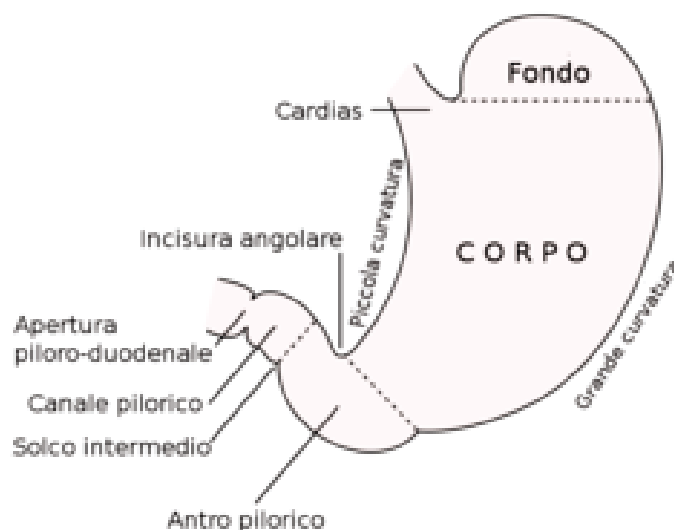


Figura 3: anatomia dello stomaco

Il corpo (corpus) dello stomaco conduce all'antrum pylorico. L'antrum pylorico si estende fino a diventare il canale pilorico, circondato dal sfintere pilorico, che unisce il duodeno a livello di L1 (piano transpilorico) a destra della linea mediana. La superficie anteriore dello stomaco è correlata al lobo sinistro (segmenti II, III e IV) del fegato, alla parete addominale anteriore e al colon trasverso distale. La superficie posteriore dello stomaco è correlata all'emidiaframma sinistro, alla milza, al rene sinistro e al pancreas (letto dello stomaco).

La borsa omentale si trova dietro lo stomaco e di fronte al pancreas, comunica con il grande omento (cavità peritoneale principale) attraverso il foramen omentale (epiploico) di Winslow dietro il legamento epatoduodale (HDL, il bordo libero del piccolo omento).

La curvatura convessa maggiore dello stomaco inizia a sinistra del cardias e decorre dal fondo lungo il bordo sinistro del corpo dello stomaco e il bordo inferiore del piloro. La curvatura meno concava inizia a destra del cardias come continuazione del bordo destro dell'esofago addominale e decorre a breve distanza lungo il bordo destro del corpo dello stomaco e del bordo superiore del piloro. La giunzione delle parti verticali e orizzontali della curvatura minore è chiamata incisura angularis. La curvatura minore è più lunga di quella maggiore. Lo stomaco e la prima parte del duodeno sono attaccati al fegato dal legamento epatogastrico (la parte sinistra del piccolo omento) contenente i vasi gastrici destro e sinistro, all'emidiaframma sinistro dal legamento gastrofrenico, alla milza dal legamento gastrosplenico/gastrolienale contenente vasi gastrici brevi e al colon trasverso dal legamento gastrocolico (parte del grande omento) contenente i vasi epiploici (omentali). Alcune bande peritoneali possono essere presenti tra la superficie posteriore dello stomaco e la superficie anteriore del pancreas. Parte del grande omento si pone come un grembiule sul colon trasversale, con 4 strati di peritoneo (spesso fusi): 2 strati scendono dallo stomaco e poi decorrono verso l'alto per essere attaccati al colon trasverso.

La vascolarizzazione dello stomaco è la seguente:

Il tronco celiaco nasce dalla superficie anteriore dell'aorta addominale a livello di L1. Ha una lunghezza breve (circa 1 cm) e si biforca nella arteria epatica comune (CHA), nell'arteria splenica e nell'arteria gastrica sinistra (LGA). L'LGA decorre verso la curvatura minore dello stomaco e si divide in un ramo ascendente (fornendo l'esofago addominale) e un ramo discendente (fornendo lo stomaco). La CHA decorre verso destra sul bordo superiore del pancreas e forma l'arteria gastroduodenale (GDA), che scende dietro la prima parte del duodeno. Dopo aver abbandonato la GDA, la CHA continua come arteria epatica propria. La arteria gastrica destra (RGA), un ramo dall'arteria epatica destra o comune, decorre lungo la curvatura minore da destra a sinistra e si unisce al ramo discendente

della LGA per formare un arco lungo la curvatura minore tra i 2 fogli del peritoneo. Questa dà le piccole arterie al corpo dello stomaco. La GDA quindi si divide nella arteria gastro-omentale destra (gastroepiploica) (RGEA) e nell'arteria pancreaticoduodenale superiore (ASPDA) anteriore; dà anche la piccola arteria sopraduodenale (di Wilkie). La RGEA decorre lungo la curvatura maggiore da destra a sinistra. L'arteria splenica decorre verso sinistra sul bordo superiore del corpo distale e della coda del pancreas e dà l'arteria gastro-epiploica (gastro-omentale) sinistra, che decorre da sinistra a destra lungo la curvatura maggiore e si unisce alla RGEA per formare un arco lungo la curvatura maggiore tra i due fogli del peritoneo del grande omento. Questa dà piccole arterie al corpo dello stomaco. L'arteria splenica dà anche 3-5 brevi arterie gastriche che decorrono nel legamento gastro-splenico (gastro-lienale) e forniscono la parte superiore della curvatura maggiore e il fundus gastrico. Pochissime arterie gastriche posteriori possono derivare dall'arteria splenica. Lo stomaco ha una ricca rete di vasi nella sua submucosa. La vena gastrica sinistra (coronaria) scarica nella vena porta alla sua formazione (dall'unione delle vene mesenteriche spleniche e superiori). Le vene gastro-omentali gastriche destre scaricano nella vena porta. La vena gastro-omentale sinistra scarica nella vena splenica, così come le vene gastriche brevi. Il pylorus è caratterizzato da una vena prepilorica (di Mayo), che si trova sulla sua superficie anteriore. Il tronco gastrocolico (GCT) di Henle è presente in un gran numero di casi e si trova all'incrocio della mesenterica intestinale e del mesocolon trasverso. Può drenare i rami dalla colica media e le vene gastro-omentali. Le arterie gastriche brevi e le vene sono a volte definite collettivamente come vasa brevia.

Il drenaggio linfatico: i linfonodi che drenano lo stomaco sono numerati e divisi in 4 livelli: Livello I (linfonodi perigastrici) - Paracardiaci destri, paracardiaci sinistri, lungo la curvatura minore, lungo la curvatura maggiore, sovrapiloricici, infrapiloricici; Livello 2 - Lungo l'LGA, lungo la CHA, lungo l'asse celiaco, allo iato splenico, lungo l'arteria splenica; Livello 3 - Nel legamento epato-duodenale, dietro il duodeno e la testa del pancreas, alla radice della mesenterica intestinale; Livello 4 - Mesocolici, paraortici.

L'innervazione: il plesso esofageo del nervo vago (para-simpatico) si trova nel mediastino posteriore al di sotto dell'ilo polmonare, si divide in 2 tronchi vagali che entrano nell'addome insieme all'esofago attraverso lo iato esofageo nella cupola sinistra del diaframma. Il vago destro (posteriore) è dietro e alla destra dell'esofago intra-addominale, mentre il vago sinistro è di fronte all'esofago intra-addominale. Il vago destro emette un ramo gastrico posteriore chiamato il nervo di Grassi, che attraversa a sinistra e fornisce il cardias e il fundus dello stomaco. Il vago destro dà un ramo celiaco (che fornisce il pancreas e il piccolo e grande intestino), e il vago sinistro dà un ramo epatico (che fornisce il fegato e la colecisti). Rispettivamente, dopo il cedimento dei rami celiaci e epatici, i tronchi vagali destro e sinistro continuano lungo la curvatura minore dello stomaco (a stretto contatto con l'arcata vascolare formata dai vasi gastrici di sinistra e destra) come nervi gastrici posteriori e anteriori che forniscono il corpo dello stomaco, dell'antro e del piloro. L'approvvigionamento nervoso simpatico allo stomaco deriva dai gangli celiaci (T5-T9).²¹

²¹Gray H, Lewis WH. Gray's. Anatomy of the Human Body. 20th ed. New York, NY: Bartleby; 2000.

2.5 Trattamento Medico

Il trattamento dell'obesità inizia con una gestione globale dello stile di vita (cioè la dieta, l'attività fisica, la modifica del comportamento).²² Le tre fasi principali di un programma di perdita di peso di successo sono le seguenti:

- Fase dello screening
- Fase della perdita di peso
- Fase del mantenimento (Questa può durare per il resto della vita del paziente, ma idealmente dura almeno un anno dopo il completamento del programma di perdita di peso).

Attualmente, i 3 principali gruppi di farmaci utilizzati per gestire l'obesità sono i seguenti:

- farmaci che compromettono l'assunzione dietetica
- farmaci che agiscono perifericamente pregiudicando l'assorbimento dietetico
- farmaci che aumentano la spesa energetica

Come per tutte le condizioni mediche croniche, la gestione efficace dell'obesità deve basarsi su una collaborazione tra un paziente altamente motivato e un team impegnato di professionisti sanitari. Questa squadra può includere il medico, uno psicologo o uno psichiatra, terapeuti fisici, dietisti e altri specialisti, a seconda delle comorbidità del singolo paziente. Le prove scientifiche indicano che i programmi multidisciplinari producono in modo affidabile e mantengono una modesta perdita di peso tra il 5 e il 10% a lungo termine.²³ Nel gennaio del 2015, la Società Endocrinologica ha rilasciato nuove linee guida sul trattamento dell'obesità per includere:²⁴

- La dieta, l'esercizio fisico e la modifica del comportamento dovrebbero essere inclusi in tutti gli approcci di gestione dell'obesità per indice di massa corporea (BMI) di 25 kg / m² o superiore. Devono essere utilizzati altri strumenti, come la farmacoterapia per BMI di 27 kg

²² Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy. *Circulation*. 2012 Mar 6. 125(9):1157-70.

²³ Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *J Am Coll Cardiol*. 2013.

²⁴ Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, et al. Pharmacological management of obesity: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Feb. 100(2):342-62.

- / m² o superiore con comorbidità o BMI superiore a 30 kg / m² e chirurgia bariatrica per BMI di 35 kg / m² con comorbilità o BMI superiore a 40 kg / m² in aggiunta alla modifica comportamentale per ridurre l'assunzione di cibo e aumentare l'attività fisica quando possibile.
- I farmaci possono amplificare l'adesione al cambiamento del comportamento e possono migliorare il funzionamento fisico in modo tale che l'aumento dell'attività fisica sia più facile in coloro che non possono fare esercizio fisico inizialmente. I pazienti che hanno una storia di incapacità nel perdere peso e mantenere il peso e che soddisfano le indicazioni dell'etichetta, sono candidati all'assunzione dei farmaci per la perdita di peso.
 - Per promuovere il mantenimento a lungo termine del peso, è suggerito l'uso di farmaci approvati per la perdita di peso (senza alcuna terapia farmacologica) per migliorare le comorbidità e amplificare l'adesione ai cambiamenti del comportamento, che possono migliorare il funzionamento fisico e consentire una maggiore attività fisica nei soggetti con un BMI di 30 kg / m² o più in individui con un BMI di 27 kg / m² e almeno una condizione medica comorbida associata (ad esempio, ipertensione, dislipidemia, diabete mellito di tipo 2 e apnea ostruttiva del sonno).
 - Se la risposta di un paziente a un farmaco per la perdita di peso è considerata efficace (perdita di peso del 5% o più del peso corporeo a 3 mesi) e sicura, si consiglia di continuare il farmaco. Se si ritiene inefficace (perdita di peso inferiore al 5% a 3 mesi) o se ci sono problemi di sicurezza o di tollerabilità in qualsiasi momento, si consiglia di interrompere il farmaco e prendere in considerazione farmaci alternativi o rinvio ad approcci di trattamento alternativi.
 - Nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 che sono in sovrappeso o obesi, farmaci antidiabetici che hanno ulteriori azioni per promuovere la perdita di peso (come [GLP-1] o [SGLT- 2]), vanno aggiunti ai farmaci di prima linea per il diabete mellito di tipo 2 (metformina).
 - Nei pazienti obesi con diabete mellito di tipo 2 che necessitano di terapia con insulina, si suggerisce almeno uno dei seguenti: metformina, pramlintide o GLP-1 agonisti per mitigare

il guadagno di peso correlato all'assunzione di insulina. L'insulina di prima linea per questo tipo di paziente dovrebbe essere l'insulina basale.

- Gli inibitori dell'angiogenesi dell'angiotensina (ACE), i bloccanti del recettore dell'angiotensina (ARBs) e i bloccanti del canale del calcio, anziché i beta-adrenergici, devono essere considerati come terapia di prima linea per l'ipertensione nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 obesi.
- Nelle donne con un BMI di $27 \text{ kg} / \text{m}^2$ o più con comorbidità o BMI di $30 \text{ kg} / \text{m}^2$ o più, che necessitino la contraccezione, sono suggeriti contraccettivi orali a condizione che le donne siano ben informate sui rischi e i benefici (cioè i contraccettivi orali non sono controindicati).

2.6 Trattamento chirurgico

2.6.1 Chirurgia Bariatrica

La terapia chirurgica per l'obesità (chirurgia bariatrica) è l'unica modalità terapeutica disponibile associata a perdita di peso clinicamente significativa e relativamente sostenuta, nei soggetti con obesità morbosa associata a comorbidità. L'evidenza dimostra che la chirurgia bariatrica ben eseguita, in pazienti accuratamente selezionati e con una buona squadra di supporto multidisciplinare, migliora notevolmente la morbidità associata all'obesità grave. Anche se la chirurgia bariatrica è l'unico metodo terapeutico associato a perdita di peso significativa e rapida, è una procedura costosa e chirurgo specifica. La selezione del paziente per le procedure bariatriche deve essere affrontata secondo le stesse rigide linee precedentemente descritte per la selezione dei pazienti per programmi di gestione medica del peso. Al massimo, i pazienti dovrebbero essere considerati candidati a queste procedure solo se hanno un BMI superiore a $40 \text{ kg} / \text{m}^2$ e / o un peso superiore a 45 kg al di sopra del peso ideale definito da età e sesso. Per soggetti con BMI di $35\text{-}40 \text{ kg} / \text{m}^2$, deve essere presente almeno una comorbidità maggiore per giustificare queste procedure. La presenza di comorbidità non è una controindicazione alle procedure chirurgiche bariatriche, tuttavia, la condizione del paziente deve essere stabilizzata e trattata adeguatamente prima dell'intervento. Le comorbidità che sono state segnalate per essere migliorate o risolte attraverso la chirurgia bariatrica includono:

- Apnea ostruttiva del sonno
- Diabete mellito di tipo 2
- Ipertensione
- Insufficienza cardiaca
- Edema periferico
- Insufficienza respiratoria
- Asma
- Dislipidemia
- Esofagite

- Pseudotumor cerebri
- Osteoartrite
- Tromboembolia
- Incontinenza urinaria

Altre evidenze suggeriscono una migliore qualità della vita e della fertilità dopo la chirurgia bariatrica.²⁵ Anche se la maggior parte delle procedure bariatriche è stata sviluppata inizialmente nell'ambito delle laparotomie, ora vengono sempre più eseguite tecniche laparoscopiche, con una ridotta morbidità postoperatoria. L'approccio laparoscopico alla chirurgia bariatrica è particolarmente sviluppato in Europa. Tra le procedure bariatriche standard vi sono le seguenti:

- Bypass gastrico Roux-en-Y
- Bendaggio gastrico regolabile
- Gastroplastica verticale
- Gastroplastica orizzontale
- Procedure di commutazione del duodeno
- Bypass biliopancreatico
- Deversione biliopancreatica
- Sleeve gastrectomy (resezione gastrica variamente definibile: verticale longitudinale, parietale o della grande curva).

I dati disponibili sull'efficacia di molte di queste procedure sono ancora relativamente scarsi. Tuttavia, le relazioni e le metanalisi da parte di numerosi pazienti sulle procedure più comuni (restrizione gastrica e bypass gastrico) favoriscono l'efficacia a lungo termine della chirurgia bariatrica. Le linee guida dell'Associazione Americana degli Endocrinologi Clinici, della Società di Obesità e della Società Americana per la Chirurgia Metabolica e Bariatrica, supportano la sleeve gastrectomy come un'efficace alternativa al bendaggio gastrico, al bypass gastrico e ad altri

²⁵ Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Sjöström CD, Karason K, Wedel H, et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. JAMA. 2012 Jan 4. 307(1):56-65.

tipi di chirurgia bariatrica. Tuttavia, le linee guida non raccomandano alcuna procedura bariatrica come preferibile rispetto ad altre per i pazienti con obesità grave.²⁶

2.6.2 Sleeve Gastrectomy

La sleeve gastrectomy laparoscopica (LSG), è un tipo di gastrectomia verticale, praticata lungo la grande curvatura, con cui si asporta completamente il fondo gastrico e si ottiene uno stomaco residuo di 60-150 ml. L'integrità della regione antro-pilorica e dell'innervazione vagale viene preservata.

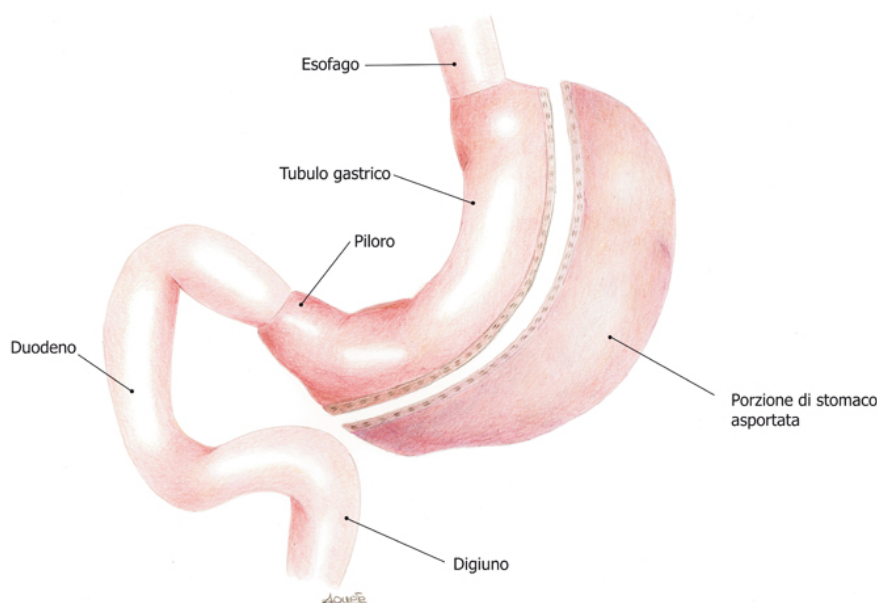


Figura 4: sleeve gastrectomy

In questa procedura, lo stomaco viene ridotto a circa il 15-20% della sua dimensione originale. Il meccanismo di perdita di peso e il miglioramento delle comorbidità che seguono la procedura possono essere correlati alla restrizione gastrica, con notevole riduzione della capacità dello stomaco con precoce senso di sazietà dopo ingestione di piccole quantità di cibo, e alla riduzione del livello di grelina, vero e proprio ormone della fame.

²⁶ Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugarman HJ, Livingston EH, et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Ann Intern Med.* 2005 Apr 5. 142(7):547-59.

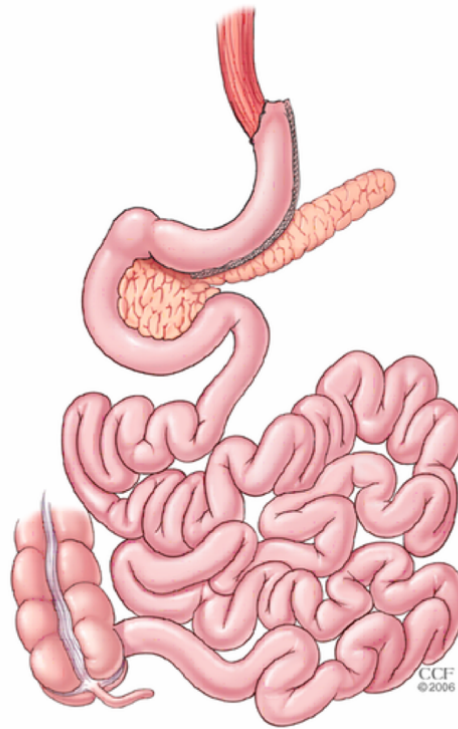


Figura 5: stomaco e intestino tenue dopo sleeve gastrectomy

Tale gastrectomia è stata utilizzata come prima fase di una procedura a due stadi per i pazienti ad alto rischio, ma a causa della sua semplicità e dei risultati favorevoli, viene attualmente proposta come procedura primaria.²⁷ Nel primo decennio del XXI secolo, negli Stati Uniti sono state eseguite centinaia di sleeve gastrectomy. Sulla base dei periodi di follow-up da 6 mesi a 3 anni, è stato evidenziato che i pazienti hanno perso il 33-83% del loro peso in eccesso. Rispetto ad altre procedure bariatriche, questa è il trattamento più fisiologico perché non determina malassorbimento, tratti digestivi anomali o il posizionamento di un corpo estraneo. Questa procedura è ampiamente eseguita laparoscopicamente.²⁸ Hutter e coll.²⁹, condussero il primo grande studio prospettico che ha confrontato i risultati di un anno di LSG ad altre procedure. I

²⁷ Regan JP, Inabnet WB, Gagner M, et al. Early experience with two-stage laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass as an alternative in the super-super obese patient. *Obes Surg.* 2003 Dec. 13(6):861-4.

²⁸ Gagner M, Gumbs AA, Milone L, Yung E, Goldenberg L, Pomp A. Laparoscopic sleeve gastrectomy for the super-super-obese (body mass index >60 kg/m(2)). *Surg Today.* 2008. 38(5):399-403.

²⁹ Hutter MM, Schirmer BD, Jones DB, Ko CY, Cohen ME, Merkow RP, et al. First Report from the American College of Surgeons Bariatric Surgery Center Network: Laparoscopic Sleeve Gastrectomy has Morbidity and Effectiveness Positioned Between the Band and the Bypass. *Ann Surg.* 2011 Sep. 254(3):410-422.

risultati mostrano che LSG ha la maggiore efficacia sulla morbidità rispetto al bendaggio gastrico regolabile laparoscopico e il bypass di Roux. Come le altre procedure bariatriche che coinvolgono la sezione dello stomaco, l'inconveniente principale della gastrectomia della manica è la gravità delle complicanze postoperatorie. L'uso del rinforzo a fasce è stato associato a risultati migliori perioperatori e può essere considerato un metodo efficace per prevenire le perdite.

2.7 La Grelina

La grelina è il ligando naturale del recettore secretogeno dell'ormone della crescita (GHS-R). Si tratta di una proteina di 28 aminoacidi con una modifica della catena dell'acido grasso sul terzo aminoacido N-terminale, importante per alcuni dei suoi effetti biologici. La grelina è stata inizialmente identificata nello stomaco e circola in concentrazioni femtomolari.

Kojima et al.³⁰ nel 1999 hanno pubblicato la scoperta della grelina, scrivendo che esistono delle piccole molecole sintetiche secretogene dell'ormone della crescita (GHS) stimolano il rilascio dell'ormone di crescita (GH) da parte dell'ipofisi, esse agiscono attraverso GHS-R, un recettore accoppiato alla proteina G il cui ligando era sconosciuto. La clonazione di GHS-R ha suggerito che esiste un ligando endogeno per il recettore e che esiste un meccanismo che regola il rilascio di GH che è distinto dalla sua regolazione da parte dell'ormone ipotalamico di crescita ormonale (GHRH). Essi hanno identificato nello stomaco del ratto un ligando endogeno specifico per GHS-R. Il ligando purificato è un peptide di 28 aminoacidi, in cui il residuo della serina 3 è n-ottanilato.



Figura 6: struttura della grelina

Il peptide acilato rilascia specificamente GH sia in vivo che in vitro ed è essenziale per l'attività. È stato quindi identificato il peptide "Ghrelin", basato sulla sua funzione di "peptide di rilascio dell'ormone della crescita" (Growth Hormone Releasing Peptide), che rilascia appunto GH (ghre è la radice della parola "crescere" "to grow"). La grelina umana è omologa a quella del ratto tranne che per due aminoacidi. La presenza della grelina sia nel ratto che nell'uomo indicava che la

³⁰ Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 1999;402:656-60.

liberazione di GH dall'ipofisi può essere regolata non solo da GHRH ipotalamico, ma anche dalla grelina.

La grelina è prodotta dalle cellule P/D1 presenti sul fondo dello stomaco e dalle cellule epsilon del pancreas (nelle isole di Langerhans). I recettori per la grelina sono espressi dai neuroni nel nucleo arcuato e nell'ipotalamo. La grelina è coinvolta nella regolazione del bilancio energetico. L'innalzamento pre-prandiale dei livelli circolanti di grelina suggerisce il suo ruolo come segnale di fame innescando l'inizio del pasto.

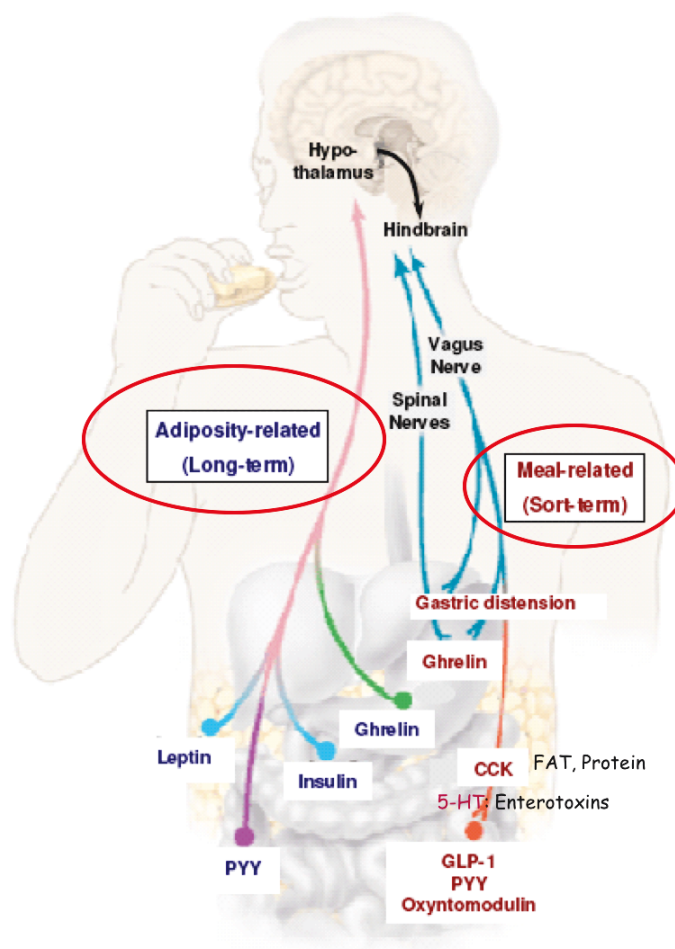


Figura 7: Le funzioni della grelina nel nostro organismo

La grelina circolante è principalmente prodotta a livello del tratto gastro-intestinale e raggiungerebbe i GHS-R nel sistema nervoso centrale, soprattutto a livello ipotalamico, attraverso la circolazione sistemica. Il primo effetto riconosciuto della grelina è stato il rilascio dell'ormone

della crescita direttamente dall'ipofisi e attraverso un'azione sull'ipotalamo. Un ulteriore effetto riconosciuto è la stimolazione dell'appetito attraverso la secrezione di neuropeptidi ipotalamici Y (NPY), molecola oressizzante, e orexina e l'inibizione dell'ormone propiomelanocortina (POMC), come risultato della grelina circolante che raggiunge l'ipotalamo o delle cellule che producono grelina che agiscono all'interno dell'ipotalamo (Figura 8).

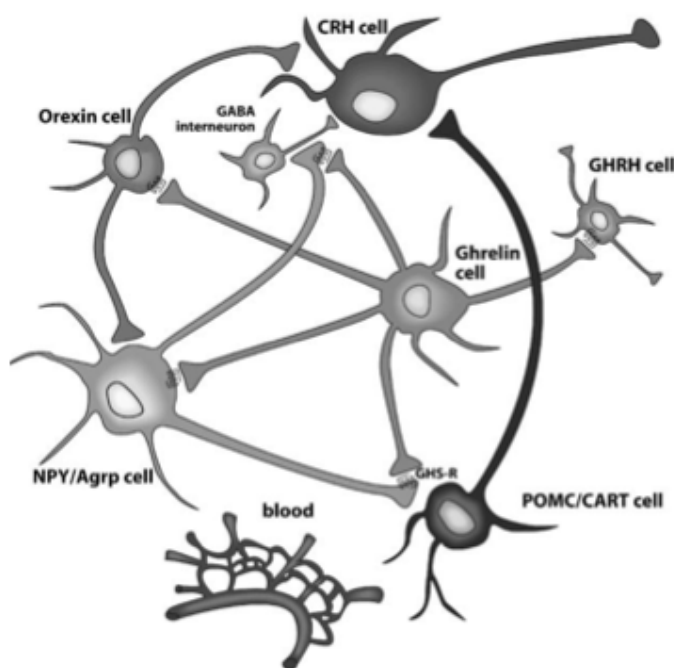


Figura 8: secrezione di neuropeptidi indotta dalla grelina

Nel SNC attiva le cellule del nucleo arcuato, compresi i neuroni rilascianti il NPY, ed attiva anche il sistema colinergico-dopaminergico mesolimbico, circuito che elabora gli aspetti edonistici delle ricompense naturali come il cibo.

Sembra che anche il vago svolga un ruolo importante sugli effetti della grelina. Inoltre sono stati riconosciuti altri effetti della grelina, inclusa la stimolazione della funzione cardiaca, un'influenza sul metabolismo dei carboidrati tramite la stimolazione dei livelli di glucosio e l'inibizione dei livelli di insulina, la stimolazione del sonno e un'influenza sulla proliferazione cellulare. La grelina, come abbiamo visto, è un ormone peptidico secreto dallo stomaco ma è anche sintetizzato in un certo numero di tessuti, condizione che indica sia effetti endocrini che paracrini. Questi

includono: stimolazione di GH e prolattina e secrezione di ACTH; aumento dell'appetito; effetto diabetogeno sul metabolismo dei carboidrati; effetti inotropici positivi sul cuore; vasodilatazione; effetti sulla proliferazione cellulare. Inoltre svolge un ruolo importante nella regolazione dell'assunzione di cibo ed ha anche un'azione neurotrofica.

La grelina è espressa, almeno a livello dell'mRNA, in tutti i tessuti studiati, mentre la distribuzione tissutale del GHS-R è molto più limitata ma non all'ipotalamo e all'ipofisi come veniva creduto originariamente. È stato evidenziato che la grelina è espressa nella tiroide, nel pancreas, nel miocardio, nella milza, nell'ovaio, nelle cellule neuronali dell'intestino e nel tessuto dello stomaco. Sia GHS-R che la grelina stimolano la liberazione della prolattina, probabilmente direttamente attraverso l'ipofisi, mentre stimolano l'asse HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) attraverso una via ipotalamica.

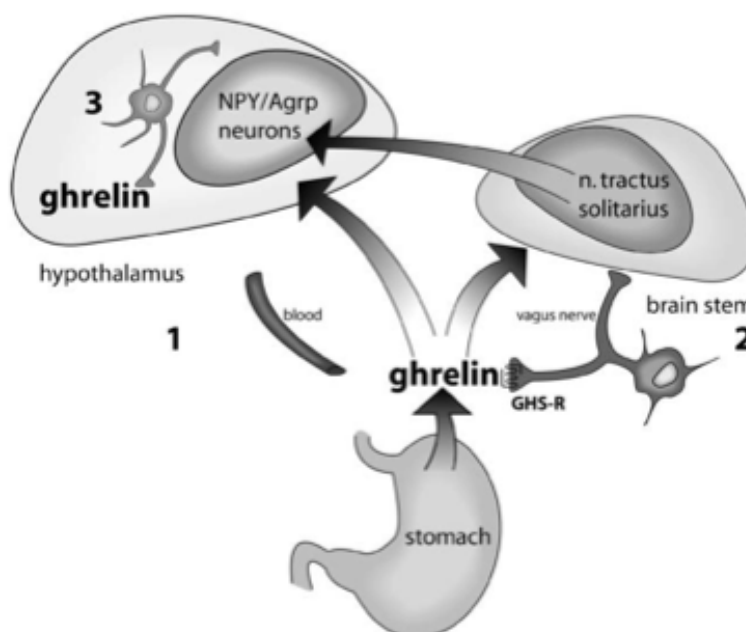


Figura 9: stimolazione ipotalamica della grelina

In conclusione, come evidenziato in letteratura, la grelina è un peptide circolante che sembra essere sintetizzato in molti tessuti, ma principalmente nello stomaco. Ha effetti diffusi sull'asse e sul metabolismo neuroendocrino, in particolare quello coinvolto nella crescita e nel controllo del peso.

Mentre i primi studi a breve e lungo termine hanno dimostrato che la somministrazione di analoghi della grelina può indurre cambiamenti sostenuti nella crescita, il potenziale a lungo termine per la manipolazione del sistema della grelina nella regolazione del peso corporeo è da esplorare.³¹

Le cellule della grelina sono una parte sostanziale della popolazione endocrina cellulare. Il ruolo delle cellule secernenti grelina nello stomaco dei pazienti obesi è poco conosciuto, pochi studi le hanno quantificate ma nessuno di essi ha utilizzato un criterio tenendo conto della variabilità della popolazione endocrina. Solo un rapporto con la popolazione endocrina totale dei singoli individui garantirà un corretto indice del numero del tipo specifico di cellule endocrine. Come vedremo nel dettaglio abbiamo usato la cromogranina come marcatore generale per le cellule endocrine dello stomaco e abbiamo calcolato la relativa percentuale delle cellule della grelina. Abbiamo anche studiato l'ultrastruttura delle cellule grelina e determinato l'espressione del gene di grelina e GOAT. Inoltre abbiamo esaminato il rapporto con le fibre nervose.

³¹ M Korbonits and A B Grossman. Ghrelin: update on a novel hormonal system. *European Journal of Endocrinology* (2004) 151 S67–S70

3. MATERIALI E METODI

Questo studio ha incluso un totale di 36 pazienti:

- 21 pazienti obesi (5 maschi e 16 femmine), di cui 12 affetti da diabete mellito (57,14%) e 5 ipertesi (23,81%), tutti sottoposti a sleeve gastrectomy laparoscopica (LSG) per obesità grave.
- 15 controlli sani (6 maschi e 9 femmine), di cui 12 biopsie di mucosa proveniente da soggetti sottoposti a screening endoscopico del tratto gastrointestinale superiore per problemi digestivi, e 3 campioni di mucosa gastrica sana proveniente da soggetti sottoposti a gastrectomia per tumore dello stomaco.

I pazienti obesi avevano un'età media di 43 anni (intervallo di età compreso fra 27-61 anni) e un indice di massa corporea (IMC) medio di 44,29 kg/m² (IMC compreso tra 35 e 53,60 kg/m²). I soggetti sani, usati come gruppo di controllo, presentavano un'età media di 53,7 anni (intervallo di età compreso fra 26-78 anni) e un IMC medio di 22,57 kg/m² (IMC compreso tra 19,38 e 27,36 kg/m²).

I criteri di esclusione comprendevano: precedente chirurgia bariatrica, malattie renali o epatiche, insufficienza cardiaca, campioni che all'esame istologico presentavano erosione e/o ulcerazione nell'epitelio della superficie della mucosa, infiltrazione di neutrofili nelle cellule parietali, e sezioni che presentavano le ghiandole del fondo dello stomaco incise trasversalmente.

Per tutti i pazienti sottoposti a sleeve gastrectomy sono stati considerati anche i valori degli esami ematochimici (in particolare i livelli di glucosio a digiuno, insulina e i livelli di HbA1c sia nel periodo pre-operatorio che post-operatorio), l'elettrocardiogramma, l'esito dell'indagine endoscopica dello stomaco e la valutazione medica generale.

Gli interventi di sleeve gastrectomy sono stati eseguiti sempre dallo stesso chirurgo e i pazienti sono stati seguiti nel periodo postoperatorio da un team multidisciplinare.

Il protocollo di studio è stato approvato nel settembre 2016 dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera “Garibaldi” di Catania, e tutti i pazienti hanno firmato il modulo del consenso informato in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki.

3.1 Procedura chirurgica

La laparoscopia è una tecnica chirurgica poco invasiva, grazie alla quale il chirurgo può accedere alla cavità addominale e alla cavità pelvica di un paziente, senza effettuare le grandi incisioni richieste dalla chirurgia tradizionale a cielo aperto.

Dopo che il paziente è stato anestetizzato, il chirurgo pratica una piccola incisione sull'addome, in corrispondenza dell'ombelico, per introdurre un piccolo tubo necessario per insufflare CO₂ ad una pressione media di 15 mmHg all'interno dell'addome (pneumoperitoneo), e per inserire il laparoscopio. Effettuata la mobilizzazione della grande curvatura dello stomaco, la resezione ha inizio con la gastrolisi della grande curvatura attraverso la resezione delle branche gastroepiploiche.

La sezione gastrica risulta essere longitudinale e parallela alla piccola curvatura gastrica e lo stomaco resecato, circa i 2/3 dell'organo, inclusi la grande tuberosità e una grande parte del corpo gastrico, viene estratto attraverso l'incisione ombelicale endobag, lasciando un "tubo" o "manicotto" gastrico, e preservando l'antro gastrico.

Le restanti parti dello stomaco vengono successivamente collegate mediante punti di sutura. La tecnica chirurgica non comporta alcun taglio o modifica dei muscoli dello sfintere che consentono al cibo di entrare o di lasciare lo stomaco, in modo da mantenere lo svuotamento gastrico. Inoltre è importante evidenziare che durante la sleeve gastrectomy nessuna parte dell'intestino viene rimossa o bypassata.

3.2 Immunoistochimica

I campioni di stomaco ottenuti dagli interventi di sleeve gastrectomy vengono immediatamente lavati con soluzione salina al fine di rimuovere eventuali detriti. Per l'immunoistochimica sono stati utilizzati tessuti fissati in formaldeide al 4% per un minimo di 24 ore. Successivamente alla fissazione, i campioni di tessuto vengono sciacquati vigorosamente per eliminare l'eccesso di fissante che potrebbe essere causa di artefatti di colorazione. A questo punto i campioni possono essere paraffinati. Il taglio delle sezioni paraffinate (4 µm di spessore) e perpendicolari allo strato mucoso, viene eseguito mediante l'uso di un microtomo a slitta (Leica RM 2135, Leica Microsystem, Milan, Italy). Vengono definiti a slitta quei microtomi in cui la lama effettua un movimento scorrevole su una guida orizzontale. La lama è fissata in un blocco che viene azionato manualmente dall'operatore avanti e indietro; durante questo percorso incontra il pezzo da tagliare. Segue poi la deparaffinizzazione e la disidratazione delle sezioni.

La colorazione immunoistochimica è stata eseguita mediante l'uso di opportuni sistemi di rilevamento specifici per ciascun anticorpo, seguendo le istruzioni del produttore e utilizzando il BenchMark ULTRA (ROCHE, Italy). Tutti gli steps sono stati effettuati a temperatura ambiente. Successivamente, la sezione è stata trattata a caldo per facilitare lo smascheramento degli epitopi usando un tampone citrato a pH 6. Dopo l'inibizione delle perossidasi endogene, con una soluzione di perossido di idrogeno al 3% per 5 minuti, le sezioni sono state incubate con i seguenti anticorpi: anti-cromogranina (1:1000) per 20' (con un pretrattamento in buffer a pH 6); anti-grelina (1:400) per 10' (con pretrattamento in buffer a pH 6); anti-enolasi neurono-specifica (NSE) (pronta per l'uso) per 20' (con pretrattamento in buffer a pH 9); anti-CD56 (1:100) per 30' (con pretrattamento in buffer a pH 6); anti-sostanza P (SP) (1:1000) per 30' (con pretrattamento in buffer a pH 6); anti-peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) (1:1000) per 20' (con pretrattamento in buffer a pH 6); anti-tirosina idrossilasi (1:200) per 20' (con pretrattamento in buffer a pH 6); anti-trasportatore vescicolare dell'acetilcolina (VAChT) (1:1000) per 30' (con

pretrattamento in buffer pH 6); anti- α -actina (pronta per l'uso) per 30' (con pretrattamento in buffer pH 6).

Alla reazione con l'anticorpo primario è seguita l'incubazione con il buffer contenente l'anticorpo secondario. Il legame antigene-anticorpo è stato osservato dopo 7 minuti di incubazione con un substrato cromogeno (3,3-diaminobenzidina) liquido. Infine, le sezioni sono state fissate e colorate con ematossilina di Mayer e poi osservate al microscopio ottico. Tra un passaggio e l'altro sono stati eseguiti lavaggi con tampone, in modo da annullare eventuali falsi positivi, e come suggerito dal datasheet, sono stati inoltre utilizzati dei controlli positivi.

3.2.1 Microscopia ottica e analisi morfometrica

- *Conta cellulare*

I campioni di tessuto dei pazienti obesi e dei pazienti controllo sono stati sottoposti a immunoistochimica con gli anticorpi anti-grelina e anti-cromogranina ed esaminati mediante microscopio ottico Axioskop40 (Carl Zeiss, Milan, Italy) fornito di camera digitale (AxioVision Rel 4.8). Di ciascun campione sono stati osservati e fotografati, con un ingrandimento 20x, dieci campi di mucosa scelti dall'operatore in maniera random, in modo da avere una misurazione il più possibile realistica. Due differenti operatori hanno poi eseguito individualmente l'analisi morfometrica, contando tutte le cellule cromogranina positive e tutte quelle grelina positive presenti nell'intera coorte delle dieci fotografie scattate per ogni campione. Le cellule sono state considerate positive solo se presentavano granuli marroni nel loro citoplasma. Per ciascun campione è stato estrapolato un numero medio di cellule grelina positive e di cellule cromogranina positive, per ed è stato poi calcolato il rapporto di cellule grelina positive rispetto a quelle cromogranina positive, ai fini di osservare quante delle cellule secernenti producessero grelina.

- *Analisi delle fibre nervose*

I campioni di tessuto dei pazienti obesi e dei pazienti controllo sono stati sottoposti a immunoistochimica con gli anticorpi anti-NSE e anti-Cd56.

Le fibre con forma allungata longitudinalmente, che presentavano immunoreattività agli antigeni NSE e CD-56 sono state considerate fibre nervose interghiandolari. L'analisi quantitativa morfometrica è stata eseguita da due diversi operatori in maniera indipendente; sono state misurate le proporzioni dell'espressione di anticorpi anti-NSE e anti CD-56 nelle sezioni in esame, avvalendosi di un sistema di analisi delle immagini che prevede l'utilizzo di un microscopio ottico, una fotocamera e un software di analisi delle immagini. Tre aree casuali di ciascuna sezione sono state scansionate in maniera random al microscopio con ingrandimento 20x e schedate. Grazie al software di analisi è stato possibile calcolare l'area percentuale dei nervi evidenziati dagli anticorpi sopra citati. Successivamente, è stata calcolata la media delle misure delle aree percentuali delle 3 immagini rappresentative di ciascuna sezione, al fine di estrapolare le proporzioni tissutali di NSE e CD-56.

Lo studio è proseguito con l'approfondimento del tipo di innervazione. A tal proposito sono stati utilizzati dei marcatori specifici: anti-TH, marcatore delle fibre efferenti adrenergiche, anti-VachT, marcatore delle fibre efferenti colinergiche, e anticorpi anti-SP e anti-CGRP per le fibre afferenti.

- *Analisi delle fibre muscolari*

I campioni di tessuto dei pazienti obesi e dei pazienti controllo sono stati sottoposti a immunoistochimica con l'anticorpo anti- α -actina, marcatore delle fibre muscolari lisce. Le fibre con forma allungata longitudinalmente, che presentavano immunoreattività verso l'antigene α -actina sono state considerate fibre muscolari.

3.3 Preparazione dei campioni anatomici per l'analisi molecolare

Parallelamente sono state condotte le analisi molecolari sui campioni di stomaco dei pazienti obesi sottoposti a sleeve gastrectomy e su quelli provenienti dai controlli sani.

I campioni prelevati dall'Unità Operativa di Chirurgia del C.C.D "G.B. Morgagni" di Catania, sono stati immersi in RNA later (inibitore delle RNAsi) e immediatamente congelati alla temperatura di -80 °C in modo da preservarne l'integrità.

Per l'analisi molecolare sono stati utilizzati circa 35mg di tessuto congelato proveniente dai pazienti obesi e da quelli oncologici (i nostri controlli sani) e circa 1 mg di tessuto congelato proveniente dai pazienti sani sottoposti a gastroscopia.

3.4 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

L'RNA totale dei campioni di tessuto congelati a -80 °C è stato estratto mediante l'utilizzo del RNeasy Mini Kit secondo il protocollo fornito dall'Azienda.

Per valutare la concentrazione dell'RNA estratto e verificare l'assenza di contaminanti quali proteine o polisaccaridi, l'RNA è stato analizzato allo spettrofotometro ND-1000 (NanoDrop, Thermo Scientific, USA). Questo strumento è uno spettrofotometro UV-Visibile a spettro totale (220-750 nm) in grado di analizzare volumi estremamente piccoli di campione (1µl) con un'elevata accuratezza e riproducibilità, consentendo un notevole risparmio di materiale. Lo strumento viene controllato da un software la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/µl. Questo spettrofotometro permette di misurare l'assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici.

Infine, per la sintesi del cDNA a singolo filamento, a partire dall'RNA totale (4µg), è stato utilizzato il Kit SuperScript III Synthesis SuperMix (Life Technologies Waltham, Massachusetts, USA).

3.5 RT-PCR Quantitativa (qRT-PCR)

La Real Time PCR, denominata anche PCR quantitativa, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA: essa misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza dell'amplificazione è influenzata minimamente

dalle variabili di reazione. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione vengono determinati a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia (C_t), permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale end point. Più elevato è il numero di copie iniziali della sequenza da amplificare, più basso sarà il C_t . Il diagramma di C_t su DNA stampo è lineare, e la pendenza della retta (slope) fornisce una misura dell'efficienza della PCR (Figura 10).

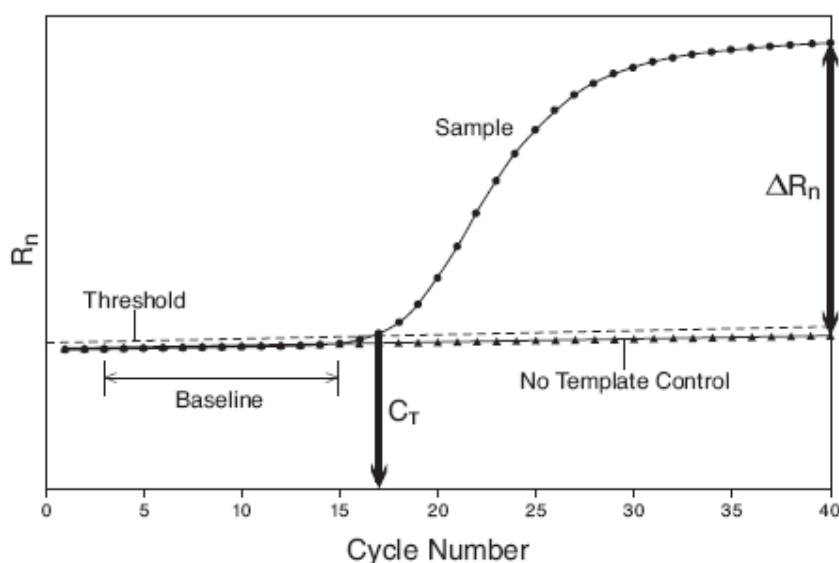


Figura 10. Tipica curva di amplificazione di una PCR Real Time. Il ciclo soglia (C_t) è rappresentato dall'intersezione della linea di *threshold* con la curva di amplificazione (da TaqMan Gene Expression Master Mix Protocol).

Alcuni strumenti forniscono dati relativi alle curve di dissociazione o di melting che seguono il completamento della PCR: questi dati danno un'indicazione sulla purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di eventuali dimeri di primers.

Per gli esperimenti di RT-PCR è stato utilizzato il Sistema OneStep real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Al fine di quantificare la variante 1 del trascritto della Grelina sono state progettate due coppie di oligonucleotidi con sequenza specifica mediante l'utilizzo dei tools per la progettazione dei primers NCBU,³² sulla base della sequenza umana di Grelina (numero di accesso: NM_016362).

Per la variante di grelina numero 1 sono stati usati i seguenti primers:

³² (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

- Fw primer 50- TCCTCTACAGTCTCATCGGCA -30
- Rv primer 50- GAGGTTGCAGTACTGGCTGAT -30

Per soppiantare le differenze di quantità dell'RNA totale di ciascun campione, essi sono stati normalizzati in ciascun dosaggio utilizzando l'espressione del gene housekeeping gliceraldehid-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come standard interno.

Per GAPDH sono stati utilizzati i seguenti primers:

- Primer Fw 50-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-30
- Primer Rv 50-TCTTACTCCTTGGAGGCCAT-30

Ciascuna reazione di Real Time PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl e condotta avvalendosi del kit Green Kit PCR QuantiFast (Qiagen Hilden, Germania) e 1 µM di primer. Infine, per ogni reazione è stato aggiunto 1 µl di cDNA diluito (50 ng / µl).

Ogni campione è stato caricato in triplice copia. Per la fase di amplificazione sono state utilizzate delle condizioni standard, ovvero: 50 °C per 2 min, 95 °C per 10 min, seguita da 40 cicli a 95 °C per 15 s, 60 °C per 1 min). Come controllo negativo, è stata eseguita una reazione priva di cDNA (NTC). Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato ed è stata inclusa una curva standard per la convalida del dosaggio per ogni coppia di primers. La quantità di mRNA del gene d'interesse è stata dedotta dal numero di cicli in cui la fluorescenza è risultata aumentata rispetto al livello di background (Ct) nella fase esponenziale della reazione di PCR.

L'mRNA, relativamente abbondante, del gene di interesse è stato dedotto dal numero di ciclo in cui la fluorescenza è risultata aumentata rispetto al livello di fondo (Ct) nella fase esponenziale della reazione di PCR.

3.6 Microscopia Elettronica

I campioni di pazienti obesi prelevati durante gli interventi di sleeve gastrectomy sono stati esaminati al microscopio elettronico (TEM). Il TEM utilizza gli stessi principi di funzionamento di un microscopio ottico solo che al posto della luce utilizza elettroni, permettendo così

ingrandimenti molto più elevati. Il TEM fornisce informazioni circa la struttura interna del campione analizzato. I passaggi principali della metodologia adottata sono:

- I frammenti di tessuto sono stati fissati in 2% di glutaraldeide e 2% di paraformaldeide in tampone di fosfato 0,1 M, a pH 7,4, per 4 ore.
- Trasferiti in tetrossido di osmio all'1%
- Incorporati in una miscela di Epon-Araldite

Le sezioni di 2 µm sono state successivamente immerse in blu di toluidina, rese ancora più sottili all'ultramicrotomo MT-X ultratome (RMC, Tucson, AZ) ed infine colorate con citrato di piombo. Per ciascun paziente sono stati esaminati tre preparati con un microscopio elettronico a trasmissione CM10 (Philips, Eindhoven, Paesi Bassi).³³

³³ S.Cinti, M.C. Zingaretti, R.Cancello, E. Ceresi, P. Ferrara. Morphological Techniques for the study of Brown Adipose Tissue and White Adipose Tissue. Pub. June 2000. From Method in Molecular Biology vol.155 Adipose Tissue Protocols

3.7 Analisi Statistica

I valori dei parametri clinici-istologici dei pazienti sono riportati come media $\pm$ deviazione standard, mentre le conte delle aree di innervazione sono descritte in percentuale.

L'analisi statistica dei dati è stata condotta mediante l'analisi della varianza utilizzando l'opzione di confronto multiplo di Duncan e le prove non parametriche di Kruskal-Wallis.

Tali test sono stati utilizzati per confrontare i valori ottenuti dalle misurazioni delle varie sezioni immunoistochimiche. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

4. RISULTATI

In questo progetto di ricerca è stata valutata la distribuzione delle cellule che producono l'ormone grelina nel fondo dello stomaco di pazienti obesi rispetto a quello dei controlli sani ed il loro grado d'innervazione.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono raccolte nella **Tabella.1**

Tabella.1

PAZIENTI	ETÀ	SESSO (M/F)	BMI (KG/M²)	DIABETE MELLITUS
G.G.	76	M	19,71	No
S.A.	78	F	20,23	No
C.P.	64	F	21,2	No
Z.P.	65	M	22,9	No
M.A.	35	M	24,9	No
B.E.	72	F	23,2	No
A.C.	77	F	21,9	No
L.V.	47	F	22,5	No
C.V.	26	M	27,36	No
S.M.	52	F	22,4	No
S.A.	38	M	25,9	No
B.F.	35	M	22,97	No
C.G.	48	F	23,21	No
V.S.	42	F	19,38	No
I.D.	51	F	20,83	No
P.L.	51	F	45,32	No
C.M.	57	F	53,60	No
P.R.	41	F	57,26	No
D.A.	46	M	44,17	No
P.E.	27	F	44,75	No
A.S.	37	F	45,55	No
B.L.	31	F	39,9	No

L.M.L.	46	F	41,27	No
P.V.R.	31	F	41,53	No
D.P.M.G	41	M	50,36	No
M.P	41	M	39,65	No
C.S.G.	35	F	44,89	SI
C.T.	54	F	47,87	SI
S.G.M.G	40	F	40,23	SI
F.L.	30	F	41,37	SI
G.G.P.	61	F	35	SI
C.S.	52	M	44,45	SI
G.A.	47	F	42,27	SI
P.F.	58	F	45,2	SI
P.S.	45	F	41,15	SI
S.G.	41	M	43,9	SI

4.1 Studio della morfologia delle ghiandole del fondo gastrico

Sezioni di fondo dello stomaco di pazienti obesi sottoposti a LSG sono state colorate con ematossilina eosina per analizzare la morfologia delle ghiandole. L'osservazione al microscopio ottico ha evidenziato la presenza di ghiandole ipertrofiche nel fondo gastrico dei pazienti obesi rispetto a quello dei pazienti non obesi, come mostrato in figura 11.

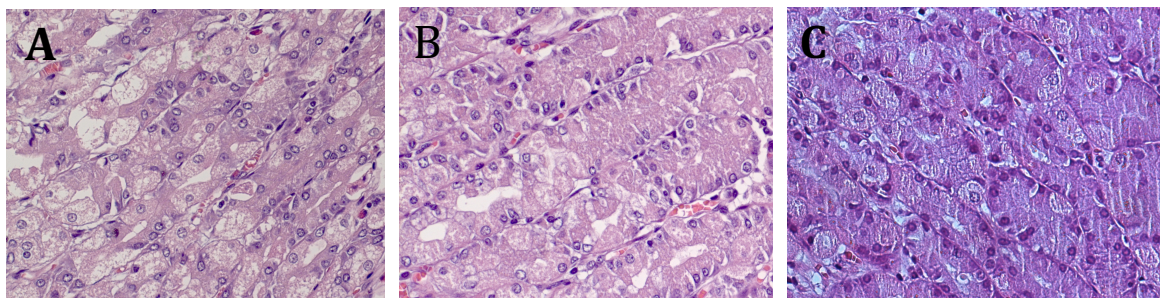


Figura 11. Ematossilina Eosina. A: Non obeso; B: obeso normoglicemico; C: obeso diabetico

4.2 Livelli di espressione della proteina grelina e del suo mRNA

Campioni di fondo dello stomaco sono stati utilizzati per valutare, con metodi immunoistochimici, l'espressione della grelina rispetto all'espressione della cromogranina in due categorie di pazienti obesi: normoglicemici e diabetici (Figura 12). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da pazienti non obesi. La cromogranina evidenzia l'intera popolazione di cellule endocrine del fondo dello stomaco, cosicché il dato che si ottiene indica i livelli della sola proteina di interesse rispetto alla totalità della popolazione secernente del fondo gastrico.

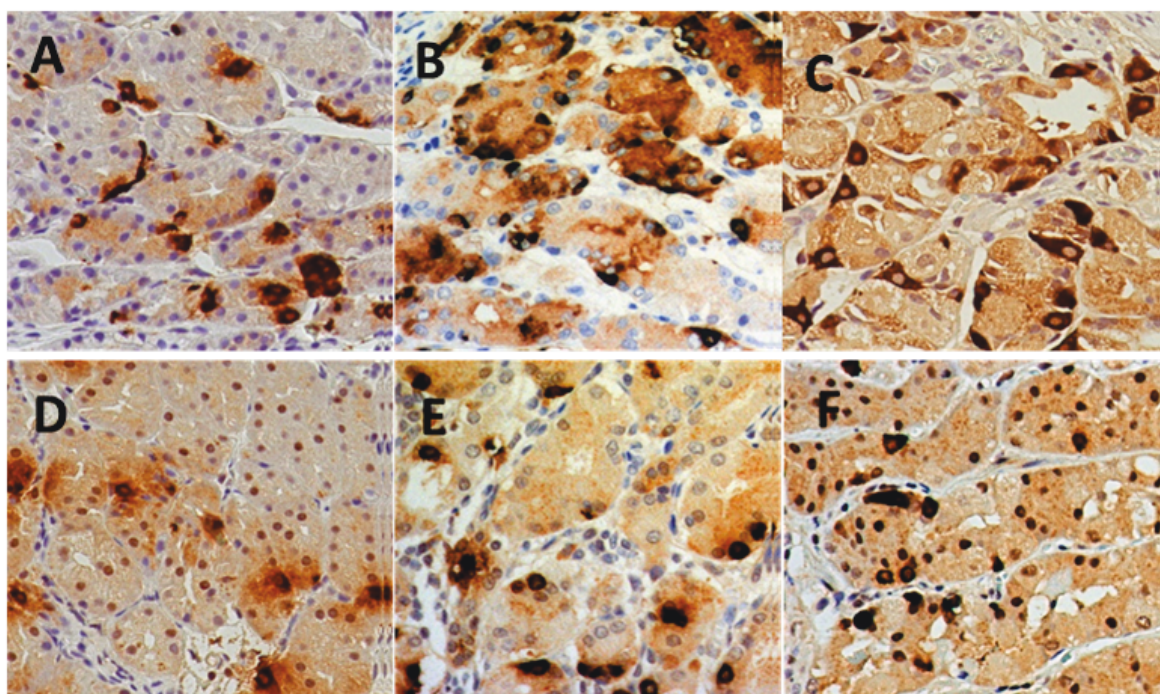


Figura 12. A: Cromogranina non obeso; B: Cromogranina obeso normoglicemico; C: Cromogranina obeso diabetico; D: Grelina non obeso; E: Grelina obeso normoglicemico; F: Grelina obeso diabetico

Si osserva una notevole variabilità nei livelli di espressione della proteina di interesse in ciascuna delle categorie di pazienti, come mostrato in Figura 13.

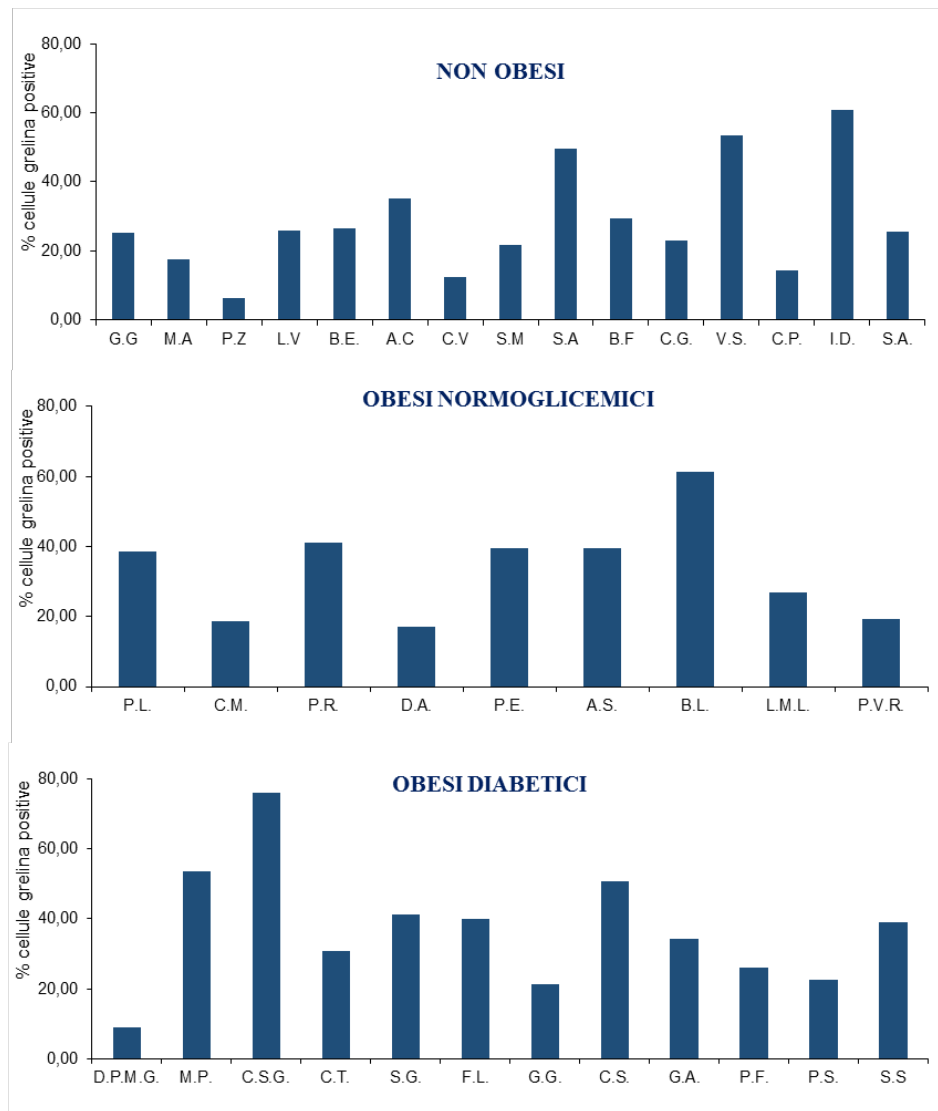


Figura 13. Percentuale di cellule grelina positive rispetto a quelle cromogranina positive nello stomaco dei pazienti esaminati

Pur osservando un valore medio di cellule grelina-positive superiore nei pazienti obesi rispetto ai non obesi, le differenze nei livelli di proteina non sono risultate statisticamente significative (Figura 14 A). La stessa analisi è stata eseguita dividendo gli obesi in base ai livelli di glicemia nel sangue e individuando così la popolazione degli obesi normoglicemici e degli obesi diabetici. Anche in questo caso il dato non è risultato significativo (Figura 14 B).

Interessante la scoperta che i livelli di espressione di grelina risultano più alti nelle donne rispetto agli uomini (53,4% vs 44,8 %).

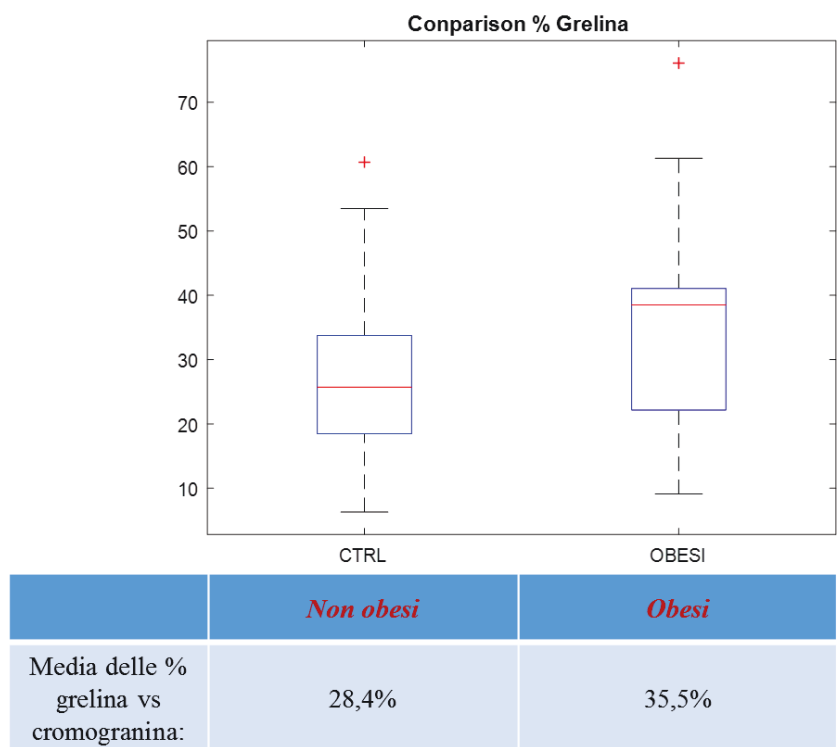
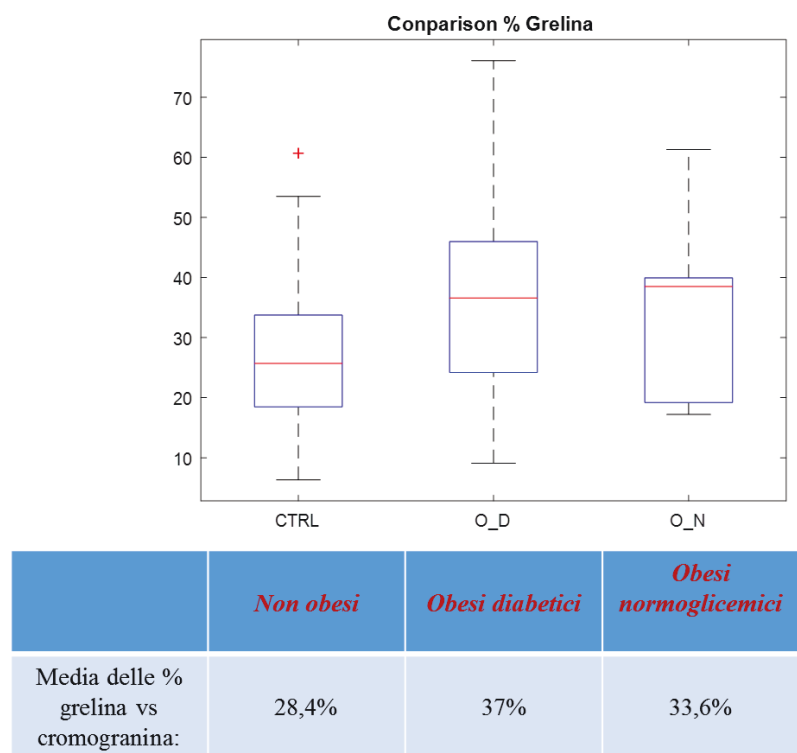


Figura 14. Box plot della % di grelina nei pazienti obesi vs non obesi (A) e nei pazienti obesi diabetici e obesi normoglicemici vs non obesi (B)

Data la scelta di misurare l'immunoreattività della grelina rispetto a quella della cromogranina, abbiamo inoltre voluto accertarci che i livelli di cellule cromogranina-positive potessero essere una misura realistica del numero di ghiandole presenti nelle sezioni di stomaco. Sono state contate le ghiandole e le relative cellule cromogranina-positive in dieci campi diversi ottenuti da sezioni di controlli, pazienti obesi normoglicemici e pazienti diabetici. In Figura 15 è riportata ciascuna delle tre categorie di pazienti, in cui la corrispondenza fra numero di ghiandole e relativo numero di cellule cromogranina-positive è rispettivamente del 80%, 90% e 80%.

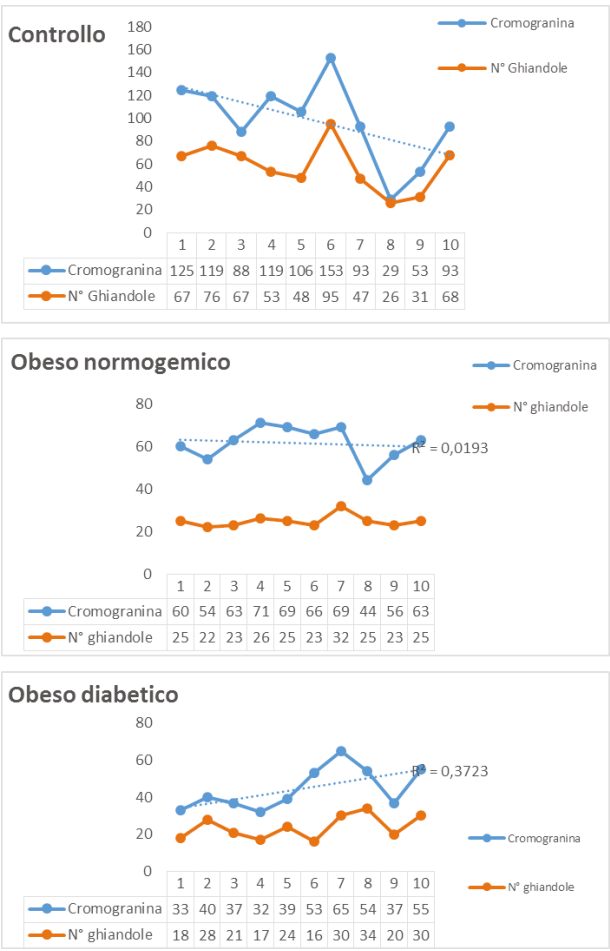


Figura 15. Confronto tra numero di ghiandole endocrine e cellule cromogranina-positive

Al fine di confermare il dato ottenuto in immunoistochimica, sono stati analizzati i livelli del trascritto della grelina (nm_016362) in tutti i pazienti presi in esame. A tale scopo è stato estratto l'RNA totale

dalla mucosa del fondo gastrico dei pazienti obesi coinvolti nello studio e sintetizzato il cDNA; sono stati quindi dosati i livelli di grelina, eseguendo un'analisi comparativa con i livelli di espressione del gene codificante per l'enzima housekeeping GAPDH. In Figura 16 sono riportati i valori di alcuni pazienti per ciascuna categoria a scopo esemplificativo. L'analisi ha rilevato che rispetto ai cinque campioni controllo riportati in grafico, i livelli di espressione del trascritto grelina sono aumentati in due pazienti diabetici e in tre pazienti normoglicemici. La stessa analisi ha dimostrato anche la presenza di campioni in cui i livelli di espressione nei pazienti obesi sono assimilabili a quelli dei controlli. Una buona correlazione (Figura 17) fra il trascritto e la proteina è stata osservata, con un $r=0,50$.

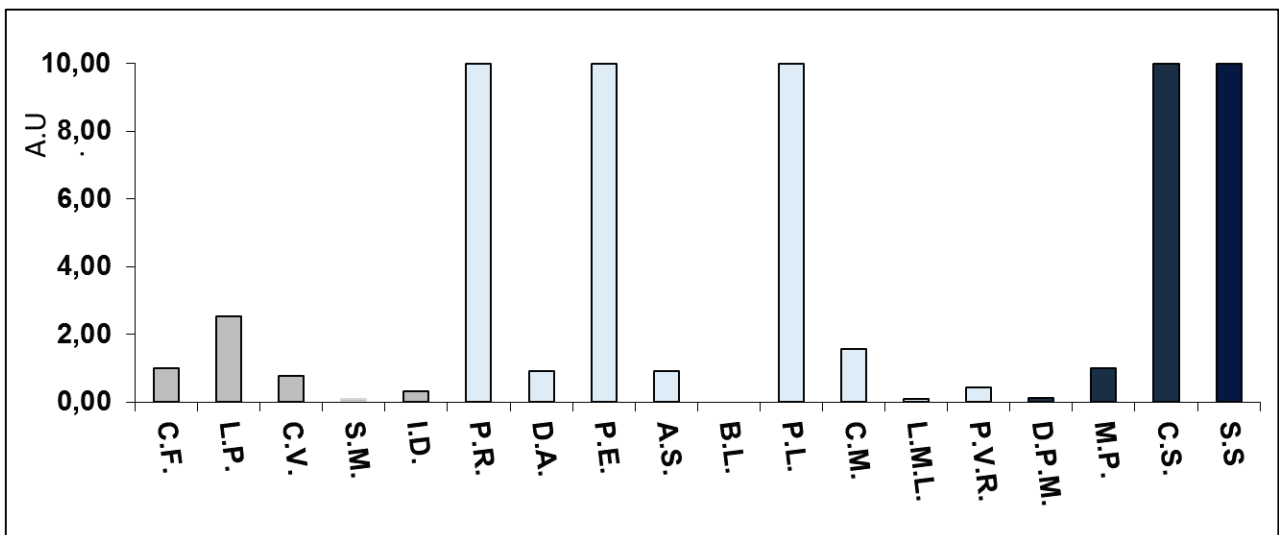


Figura 16. Sono illustrati in grigio i Controlli, in azzurro gli Obesi Normoglicemici, in blu gli Obesi Diabetici

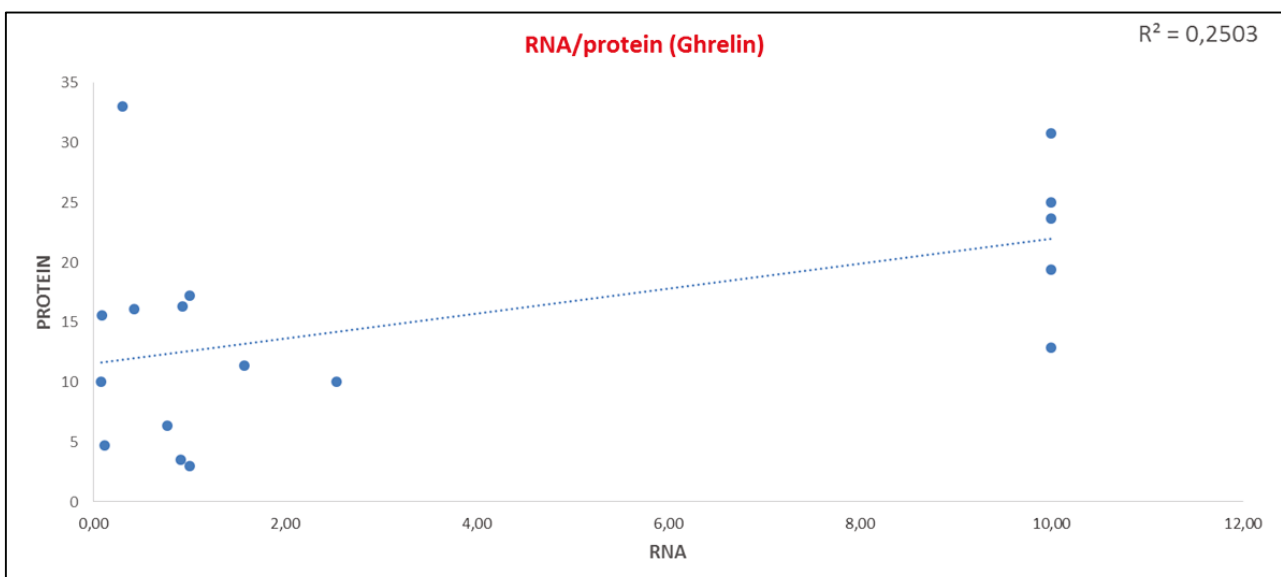


Figura 17. Correlazione tra i livelli di trascritto e di proteina grelina

Considerando invece il valore medio del mRNA della grelina derivante da tutti i pazienti in ciascuna categoria, l'analisi molecolare ha evidenziato una notevole riduzione dei livelli del messaggero nei pazienti obesi rispetto ai controlli non obesi indipendentemente dai livelli di glicemia nel sangue (Figura 18).

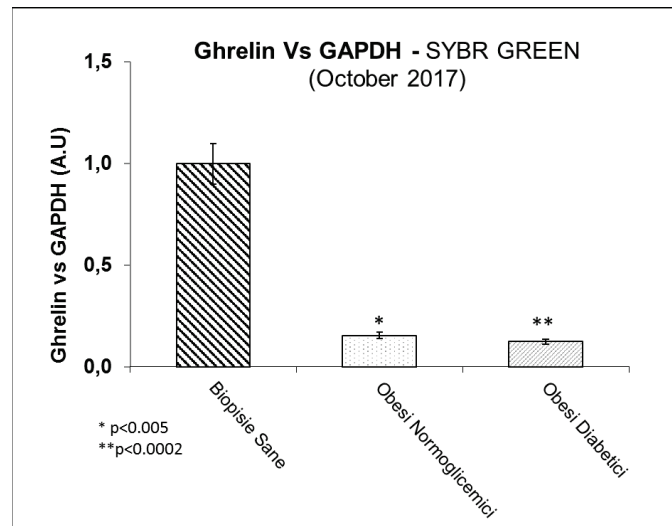


Figura 18. In grafico sono illustrati i valori medi del mRNA della grelina

4.3 Analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione

I campioni di stomaco dei pazienti obesi e dei controlli sono stati analizzati al microscopio elettronico a trasmissione CM10 (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

Le cellule endocrine dello stomaco che secernono grelina sono distinguibili al microscopio elettronico grazie a caratteristiche specifiche (Figura 19), quali:

- Presenza di grandi granuli di lipofuscina
- Presenza di microfilamenti perinucleari
- Presenza di densi granuli endocrini

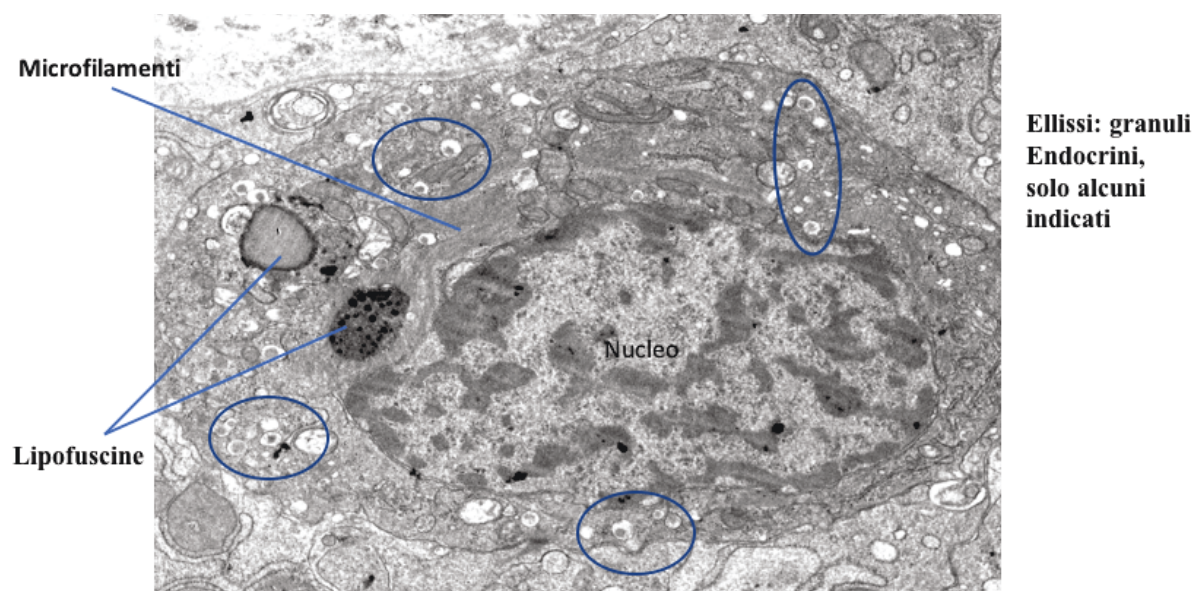


Figura 19. Immagine al microscopio elettronico di una ghiandola endocrina

In questo studio è stato osservato che in condizioni di obesità non risulta modificata la morfologia della ghiandola endocrina grelina-positiva.

4.4 Grado d'innervazione del fondo dello stomaco

L'esame immunoistochimico con anticorpi anti-NSE e anti-CD56 ha permesso di osservare una notevole quantità di strutture allungate, interposte fra le ghiandole dello stomaco, nel fondo dello stomaco dei pazienti obesi (Figura 20).

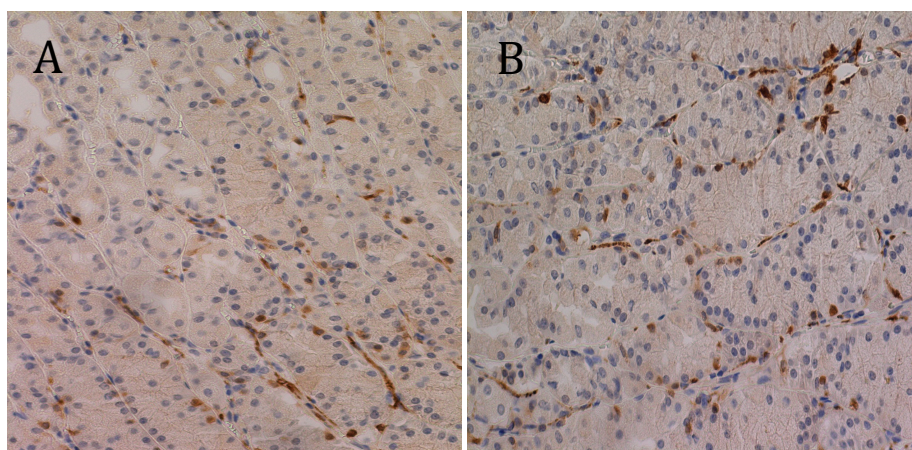


Figura 20. A: NSE obeso normoglicemico; B: CD-56 obeso normoglicemico

La positività è risultata meno accentuata nei controlli non obesi. A causa della loro forma caratteristica, abbiamo ipotizzato che queste potessero essere fibre nervose.

Nel tentativo di stabilire se tali fibre fossero viscer-effettrici o sensitive, abbiamo condotto una serie di analisi immuistochimiche utilizzando anticorpi specifici (anti-TH, anti-VachT, anti-SP e anti-CGRP), utilizzando per ognuno il rispettivo controllo positivo. In maniera inaspettata, nessuno degli anticorpi utilizzati ha dato un risultato positivo (Figura 21), lasciando ipotizzare che l'immunoreattività agli anticorpi anti-NSE e anti CD56 fosse un dato aspecifico.

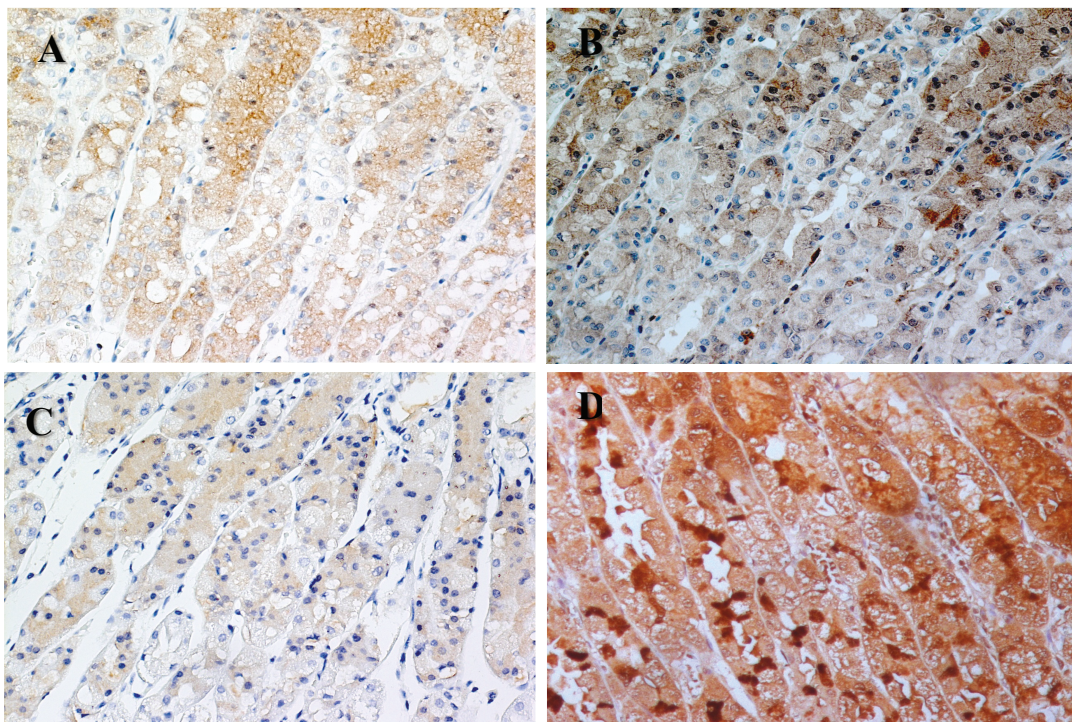


Figura 21. A: SP obeso normoglicemico; B: CGRP obeso normoglicemico; C: TH obeso normoglicemico; D: VAChT obeso normoglicemico

Poiché entrambi gli anticorpi consentono di riconoscere anche le fibre muscolari lisce, i campioni sono stati analizzati anche con l' anticorpo anti α -actina, specifico per le fibre muscolari lisce. L' anticorpo ha evidenziato le stesse strutture allungate, interposte fra le ghiandole dello stomaco, che risultavano visibili dopo l' utilizzo degli anticorpi anti-NSE e anti-CD-56. Ciò ci ha permesso di escludere un aumento del grado di innervazione dello stomaco dei pazienti obesi, come inizialmente ipotizzato, confermando invece l' esistenza di fibre muscolari lisce che si allontanano dalla *muscularis mucosae* e si portano verso la tonaca mucosa (Fig. 22).

La microscopia elettronica ha permesso di confermare questo risultato (dato non mostrato).

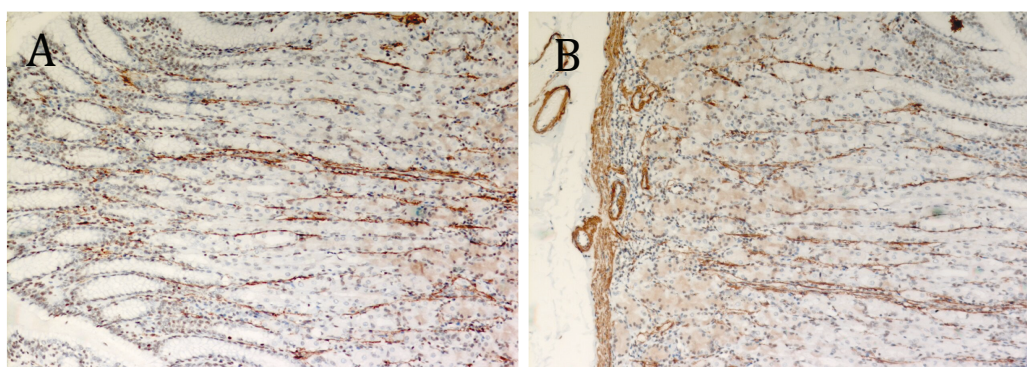


Figura 22. Actina in obeso normoglicemico. A: colletto della tonaca mucosa; B: parte profonda della tonaca

5. DISCUSSIONE

Molti fattori sono responsabili dello sviluppo dell'obesità. Tuttavia, il fattore più importante è la disregolazione del bilancio energetico a favore dell'assunzione dei nutrienti. Molti organi, in particolare l'ipotalamo, garantiscono l'equilibrio di tale bilancio e alcuni peptidi specifici consentono la comunicazione tra i diversi tessuti. La grelina, peptide oreogenico che aumenta l'appetito e quindi l'assunzione di cibo, contribuendo al mantenimento dell'equilibrio energetico, è uno dei più importanti. Scoperta nel 1999 dallo scienziato giapponese Masayasu Kojima, essa viene secreta principalmente dal fondo dello stomaco.³⁴

A causa del notevole aumento dei casi di obesità, che sta assumendo un carattere epidemico, il numero di procedure chirurgiche bariatriche è in rapida ascesa.³⁵ La chirurgia bariatrica rimane il metodo più efficace per la perdita di peso sostenuta negli adulti obesi,³⁶ ma l'esatto meccanismo della perdita di peso rimane ancora poco compreso. Questo meccanismo è complesso e non può essere confinato alle condizioni restrittive o di malassorbimento risultanti da queste procedure. Esistono numerosi studi che suggeriscono il ruolo cruciale svolto da vari ormoni nella percezione del senso di fame e sazietà e nella spesa energetica. Tuttavia, i risultati derivanti dalle diverse ricerche sono poco concordi tra loro. Gündoğan e coll.³⁷ hanno pubblicato i risultati del loro studio, che confermava che il numero di cellule produttrici di grelina era significativamente maggiore nel corpo prossimale rispetto al corpo distale dello stomaco. Ritze e coll.,³⁸ hanno studiato l'espressione di grelina e leptina e il ruolo del sistema serotoninergico nel tessuto dello stomaco e nel siero di individui obesi e non obesi. È stato evidenziato che nel tessuto gastrico, le cellule che esprimono l'enzima acetilante della grelina (GOAT) sono ridotte, ma le cellule

³⁴ Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 1999;402:656-60.

³⁵ Maggard, M.A. (2005) Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Annals of Internal Medicine*, 5, 547–559.

³⁶ Buchwald, H., Estok, R., Fahrbach, K. et al. (2007) Trends in mortality in bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Surgery*, 142, 621–632. discussion 632–635.

³⁷ Mehmet GÜNDOĞAN1, Neşe ÇALIŞ DEİRKAN1, Koray TEKİN2, Hülya AYBEK3. Gastric Histopathological Findings and Ghrelin Expression in morbid Obesity. *Türk Patoloji Derg* 2013, 29:19-26

³⁸ Y.RITZE*,†A.SCHOLLENBERGER*,M.HAMZESINNO*,N.BUEHLER*,M.BOEHLE*,G.BARDOS*,H.SAUER,†I.MACK,‡P.ENCK,‡S.ZIPFEL,†T.MEILE,§A.KOENIGSRAINER,§M.KRAMER†¶&S.C.BISCHOFF*. Gastric ghrelin, GOAT, leptin, and leptinR expression as well as peripheral serotonin are dysregulated in humans with obesity. *Neurogastroenterol Motil* (2016) 28, 806–815.

grelina-positive e il corrispondente mRNA sono aumentati negli individui obesi rispetto ai non obesi. L'espressione di mRNA della leptina gastrica e le concentrazioni di leptina nel siero sono aumentate negli individui obesi rispetto ai non obesi. I dati indicano che l'obesità causa una disregolazione degli ormoni gastrointestinali sia a livello tissutale che sierico, oltre ad una correlazione negativa con un aumento dei marcatori di infiammazione subclinica. L'infiammazione indotta dall'obesità stimola l'espressione e la secrezione di citochine come IL6, IL8 e MCP1 dagli adipociti. La sovrapproduzione di IL8 e MCP1 può essere direttamente legata al diabete di tipo 2 nei pazienti obesi. Questo studio fornisce nuove conoscenze sull'espressione dei marcatori serotoninergici e infiammatori regolanti il peso di soggetti obesi e normali. Nel loro modello ipotetico di interazione neuroendocrina gastrica, gli autori sostengono che le cellule gastriche, così come le cellule nervose afferenti vagali, siano coinvolte nella segnalazione periferica. La grelina e la leptina, in parallelo alla serotonina, possono agire sulle fibre vagali afferenti fornendo così un segnale di ingresso al sistema nervoso centrale per modulare il comportamento alimentare. Pare che molte delle possibili interazioni avvengano a livello di fattori di transizione, che non sono ancora stati identificati. I modelli di espressione neuroendocrina gastrointestinale e periferica nell'obesità costituiscono una sfida per i ricercatori a causa del coinvolgimento di numerosi fattori metabolici e infiammatori.

Kruljac e coll.,³⁹ hanno valutato i cambiamenti negli ormoni metabolici (grelina, leptina, insulina, ormone della crescita, HOMA-IR e HOMA- β) dopo la chirurgia bariatrica e il loro ruolo come predittori della perdita di peso in 51 pazienti sottoposti a differenti tipologie di chirurgia bariatrica. Gli autori hanno evidenziato che il pattern di perdita di peso era simile in tutti i gruppi. Tuttavia, nel gruppo sottoposto a LSG le concentrazioni basali di grelina sono state predittive di una perdita di peso con sensibilità del 81,8% e specificità del 100,0%, evidenziando che la LSG è la procedura più efficace per il miglioramento della funzione delle cellule β e gettando le basi

³⁹ Ivan Kruljac; Gorana Mirošević; Lora S. Kirigin; Marko Nikolić; Neven Ljubičić; Ivan Budimir; Miroslav Bekavac Bešlin; Milan Vrkljan. Changes in Metabolic Hormones After Bariatric Surgery and Their Predictive Impact on Weight Loss. Clin Endocrinol. 2016;85(6):852-860.

per studi di convalida, al fine di confermare il ruolo della grelina nel predire la perdita di peso dopo la chirurgia bariatrica e nella selezione dei candidati per determinate procedure bariatriche. Appare pertanto evidente che la possibilità di intervenire sul ruolo che alcuni ormoni, e in particolare la grelina, hanno sul peso corporeo, sulla crescita e sull'appetito è un interessante campo di ricerca su cui vari ricercatori hanno focalizzato l'attenzione. A conferma di ciò, Miyazaki e coll.⁴⁰ per primi hanno studiato l'espressione della grelina nello stomaco e il suo significato clinico nei pazienti obesi, evidenziando che il numero di cellule grelina-positive era superiore nei pazienti obesi rispetto ai pazienti non obesi e variava individualmente indipendentemente dal peso corporeo, suggerendo che l'espressione della grelina nella mucosa gastrica potesse essere un fattore prognostico dopo l'intervento chirurgico.

Nel nostro studio è stato stimato il numero di cellule grelina-positive presenti nella mucosa gastrica dei pazienti obesi e confrontato con quello dei pazienti non obesi. Il dato ottenuto è particolarmente interessante in quanto calcolato riferendosi all'intera popolazione di cellule endocrine, marcate con l'anticorpo anti-cromogranina. Diversamente da altri studi⁴¹, a seguito di un'accurata analisi molecolare e istologica, i conteggi del numero di GPC dei pazienti obesi non risultano statisticamente significativi rispetto ai controlli. L'espressione del messaggero della grelina è stata misurata sul fondo dello stomaco dei pazienti sottoposti a LSG utilizzando la rt-PCR sui campioni forniti. L'analisi molecolare ha evidenziato una notevole riduzione dei livelli di mRNA nei pazienti obesi rispetto ai controlli non obesi. Ciò non contraddice il dato riguardante l'espressione proteica della grelina, ma può invece lasciare ipotizzare che all'interno delle cellule del fondo gastrico dei pazienti obesi ci sia un rapido turn-over post-trascrizionale. Questo mantiene bassi i livelli di mRNA all'interno della cellula, favorendo un accumulo, seppur non significativo, della corrispondente proteina, come abbiamo dimostrato. Le analisi

⁴⁰ Yasuhiro Miyazaki • Shuji Takiguchi • Yosuke Seki • Kazunori Kasama • Tsuyoshi Takahashi • Yukinori Kurokawa • Makoto Yamasaki • Hiroshi Miyata • Kiyokazu Nakajima • Masaki Mori • Yuichiro Doki. Clinical Significance of Ghrelin Expression in the Gastric Mucosa of Morbidly Obese Patients. *World J Surg* (2013) 37:2883–2890.

immunoistochimica e molecolare concordano invece nell' evidenziare una notevole variabilità di espressione della grelina all' interno di ciascuna delle popolazioni di pazienti (obesi e non obesi) presa in esame. Ciò pone le basi per ipotizzare la presenza di più sottotipi di pazienti obesi con espressione variabile di grelina. Ulteriori analisi sono in corso per confermare le due sottocategorie.

Il dato è da prendere altamente in considerazione, tenendo presente il ruolo che la grelina ha nei complessi meccanismi del mantenimento del bilancio energetico, come riportato in letteratura e precedentemente descritto. I livelli di grelina di ciascun paziente potrebbero infatti essere, insieme ad altri fattori non ancora approfonditi, predittivi della risposta, in termini di perdita di peso, alla chirurgia bariatrica.

6. CONCLUSIONI

I risultati che abbiamo ottenuto ci hanno permesso di avere una conoscenza più approfondita della morfologia del fondo gastrico dei soggetti obesi; è stato infatti effettuato uno studio valutando parallelamente i livelli di grelina sia da un punto di vista istologico che molecolare; è stata inoltre analizzata l' ultrastruttura della cellula grelina-positiva. Sebbene lo studio abbia diverse limitazioni come la piccola popolazione analizzata e la mancanza di un adeguato periodo di follow-up, i risultati sono interessanti e possono costituire uno spunto per ricerche future con una coorte di campioni più ampia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Roundtable on Obesity Solutions, Food and Nutrition Board, Health and Medicine Division, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Obesity in the Early Childhood Years: State of the Science and Implementation of Promising Solutions: Workshop Summary. 2016.
2. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. JAMA. 2012. 307(5):491-7
3. www.istat.it
4. Cawley J, Meyerhoefer C. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. J Health Econ. 2012.(1):219-30.
5. Molarius A, Seidell JC, Sans S, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Varying sensitivity of waist action levels to identify subjects with overweight or obesity in 19 populations of the WHO MONICA Project. J Clin Epidemiol. 1999. 52(12):1213-24
6. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE et al. Annual deaths attributable to obesity in the United States. JAMA. 1999. 282(16):1530-8.
7. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight Adults. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. Am J Clin Nutr. 1998. 68(4):899-917.
8. Bray GA. Health hazards of obesity. Endocrinol Metab Clin North Am. 1996. 25(4):907-19.
9. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. JAMA. 2005. 293(15):1861-7.

10. Martinelli CE, Keogh JM, Greenfield JR, Henning E et al. Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011. 96(1):E181-8.
11. Hamdy O. The role of adipose tissue as an endocrine gland. *Curr Diab Rep.* 2005. 5(5):317-9
12. Physical Activity: Facts about Physical Activity. Centers for Disease Control and Prevention. 2013.
13. Bouchard C, Tremblay A, Després JP, et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med.* 1990. 322(21):1477-82.
14. Freeman E, Fletcher R, Collins CE, et al. Preventing and treating childhood obesity: time to target fathers. *Int J Obes (Lond).* 2012. 36(1):12-5.
15. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation.* 2004. 109(3):433-8.
16. Tan CE, Ma S, Wai D et al. Can we apply the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel definition of the metabolic syndrome to Asians. *Diabetes Care.* 2004. 27(5):1182-6.
17. Montonen J, Boeing H, Schleicher E et al. Association of changes in body mass index during earlier adulthood and later adulthood with circulating obesity biomarker concentrations in middle-aged men and women. *Diabetologia.* 2011. 54(7):1676-83.
18. Sugerman HJ. Effects of increased intra-abdominal pressure in severe obesity. *Surg Clin North Am.* 2001. 81(5):1063-75, vi.
19. Hackethal V. Obese women may have 25% increased risk for stillbirth. *Medscape Medical News.* 2014.

20. Abdullah A, Amin FA, Hanum F, et al. Estimating the risk of type-2 diabetes using obese-years in a contemporary population of the Framingham Study. *Glob Health Action*. 2016. 9:30421.
21. Gray H, Lewis WH. Gray's. *Anatomy of the Human Body*. 20th ed. New York, NY: Bartleby; 2000.
22. Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy. *Circulation*. 2012. 125(9):1157-70.
23. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *J Am Coll Cardiol*. 2013.
24. Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, et al. Pharmacological management of obesity: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015. 100(2):342-62.
25. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA*. 2012. 307(1):56-65.
26. Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Ann Intern Med*. 2005. 142(7):547-59.
27. Regan JP, Inabnet WB, Gagner M, et al. Early experience with two-stage laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass as an alternative in the super-super obese patient. *Obes Surg*. 2003. 13(6):861-4
28. Gagner M, Gumbs AA, Milone L et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy for the super-super-obese (body mass index >60 kg/m(2)). *Surg Today*. 2008. 38(5):399-403.
29. Hutter MM, Schirmer BD, Jones DB et al. First Report from the American College of Surgeons Bariatric Surgery Center Network: Laparoscopic Sleeve Gastrectomy has

- Morbidity and Effectiveness Positioned Between the Band and the Bypass. *Ann Surg*. 201. 254(3):410-422.
30. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 1999;402:656-60.
 31. M Korbonits and A B Grossman. Ghrelin: update on a novel hormonal system. *European Journal of Endocrinology* (2004) 151 S67–S70
 32. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)
 33. S.Cinti, M.C. Zingaretti, R.Cancello et al. Morphological Techniques for the study of Brown Adipose Tissue and White Adipose Tissue. Pub. June 2000. From Method in Molecular Biology vol.155 Adipose Tissue Protocols
 34. Kojima M, Hosoda H, Date Y et al. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 1999;402:656-60.
 35. Maggard M.A. (2005) Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Annals of Internal Medicine*, 5, 547–559.
 36. Buchwald H, Estok R, Fahrenbach K. et al. (2007) Trends in mortality in bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Surgery*, 142, 621–632.
 37. M. Gündoğan, N.Ç. Demirkan, K. Tekin, H. Aybek. Gastric Histopathological Findings and Ghrelin Expression in morbid Obesity. *Turk Patoloji Derg* 2013, 29:19-26
 38. S.Barja-Fernandez, C. Folgueira, Castelao, C. et al. (2008) Peripheral signals mediate the beneficial effects of gastric surgery in obesity. *Gastroenterology Research and Practice*, 560938.
 39. Y.Ritze,A.Schollenberger,M.Hamzesinno et al. Gastric ghrelin, GOAT, leptin, and leptinR expression as well as peripheral serotonin are dysregulated in humans with obesity. *Neurogastroenterol Motil* (2016) 28, 806–815.

40. I. Kruljac; G. Mirošević; L.S. Kirigin et al. Changes in Metabolic Hormones After Bariatric Surgery and Their Predictive Impact on Weight Loss. Clin Endocrinol. 2016;85(6):852-860.
41. Y. Miyazaki, S. Takiguchi, Y. Seki et al. Clinical Significance of Ghrelin Expression in the Gastric Mucosa of Morbidly Obese Patients. World J Surg (2013) 37:2883–2890.