

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
Colegio de Ciencias de la Salud

Peptide YY and Oxyntomodulin novel gene therapy
treatment for obesity

Andrés Acosta Cárdenas

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención
de título de Médico

Quito
Agosto, 2006

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Peptide YY and Oxynomodulin novel gene therapy
treatment for obesity

Andres Acosta Cardenas

Marco Fornasini., M.D., PhD
Director de Tesis

.....
(firma)

Sergei Zolotukhin, PhD*
Powell Gene Therapy Center
University of Florida
Miembro del Comité de Tesis

Enrique Noboa, MD
Decano del Colegio
Ciencias De la Salud

.....
(firma)

Quito, Agosto, 2006

© Derechos de autor
Andrés Acosta Cárdenas
2006

Dedicatoria:

A Constancia por siempre estar a mi lado

Agradecimientos:

Mis más sinceros agradecimientos al Powell Gene Therapy Center de la Universidad de Florida, especialmente a Sergei, mi mentor y a George, Vadim y Ken por todo su ayuda y paciencia. Al Colegio de Ciencias de la Salud de la USFQ, especialmente a Marco, Manuel, Carlos, Enrique y Gonzalo. Y a mi familia por siempre apoyarme en todas las actividades que realizo.

Peptide YY and Oxyntomodulin novel gene therapy treatment for obesity

Resumen:

Introducción: La Obesidad, la epidemia de este nuevo siglo, se ha convertido en un reto científico debido a su relación directa con enfermedades crónicas y la falta de un tratamiento adecuado a largo plazo. En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, la Terapia con Genes se convierte en una nueva alternativa para combatir esta epidemia que acecha a todo el mundo. Sin embargo, es importante entender como funciona nuestro mecanismo del hambre, saciedad y gasto calórico; en donde el Péptido YY y la Oxintomodulina juegan un papel fundamental en el control de ingesta calórico. **Materiales y Métodos:** Construir un fragmento con el gen de PYY y OXM e introducirlo en el virus Adeno-asociado 2-8 (AAV2-8). Inyectar a ratones no obesos para probar la secreción de ambos péptido en nivel sanguíneo y lograr disminuir de peso a los ratones. **Discusión:** El AVV 2-8 PYY y OXM fueron construidos con éxito. Ahora se debe probar que el virus llegara a las células endocrinas del intestino y se secretara PYY y OXM.

Tabla de Contenido

1. Introducción	Pág. 1
2. Objetivos	Pág. 10
3. Materiales y Métodos	Pág. 11
4. Resultados	Pág. 13
5. Discusión	Pág. 19
6. Bibliografía	Pág. 21
7. Anexos (Lista de gráficos)	Pág. 37
8. Anexos (Lista de gráficos)	Pág. 51

Introducción:

La obesidad, la epidemia del siglo XXI, se define como el exceso de tejido adiposo. La mejor manera de medir subjetivamente la obesidad es calculando el Índice de Masa Corporal (IMC), que se lo calcula dividiendo el peso (Kg.) para la altura al cuadrado (m^2). Según el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, se clasifica el IMC como normal: 19 a 24.9 Kg./ m^2 ; sobrepeso: 25 a 29.9 Kg./ m^2 ; obesidad Grado I: 30 a 34.9 Kg./ m^2 ; obesidad Grado II: 35 a 39.9 Kg./ m^2 ; y obesidad Grado III o Mórbida: >40 Kg./ m^2 .¹ Sin embargo, actualmente se considera a la Resonancia Magnética Nuclear el “gold Standard” para el diagnóstico de adiposidad.²

La Organización Mundial de la Salud describe a la epidemia de la obesidad como “Globesity” (termino en ingles), debido a que existen mas de 300 millones de personas en el mundo que sufren de obesidad y a que este valor se ha triplicado en los últimos 20 años.³ En el año 2000, el número de obesos superó al número de desnutridos en el mundo. En los Estados Unidos de Norteamérica, el Nacional Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) reporta cifras alarmantes debido a que el 64% de su población sufre de sobrepeso, el 30.5% de la población son obesos y el 3.4% de la población tienen obesidad mórbida.^{4,5,6,7}

La obesidad ha aumentado en cada región, raza, género y nivel educacional en los Estados Unidos. Se presenta en mayor proporción en las mujeres mayores de 40 años de raza afro-americana.^{5,8} Sin embargo, la obesidad se está incrementando de manera significativa en niños y adolescentes de países desarrollados y en vías de desarrollo.^{2,9,10,11}

La etiología de la obesidad es compleja como muchas de las enfermedades crónicas. Sin embargo, hasta hace poco se creía que la obesidad se relacionaba solamente con la ingesta calórica. Ahora sabemos que existe un patrón genético, factores medio ambientales y psicológicos que influyen en esta patología. Se han determinado varias poblaciones como los indios Pima con variantes genéticas relacionadas con la obesidad^{12,13} y se han determinado varios genes relacionados con el metabolismo energético y el gasto calórico, en los cuales sus mutaciones causan obesidad mórbida o severa¹⁴. Sin embargo, para muchos el factor ambiental o de estilo de vida, es el más significativo debido a la alta ingesta calórica, alta ingesta de bebidas no-alcohólicas y la facilidad de comida rápida¹⁵; acompañada de la disminución de ejercicio y gasto calórico.¹⁶ Por último, los factores psicológicos son muy influyentes en varios individuos quienes demuestran mediante la ingesta excesiva de alimentos de forma desordena sus crisis de ansiedad, depresión o cualquier tipo de desorden psicológico mal controlado.¹⁷ Al mismo tiempo existen otras patologías como hipotiroidismo, enfermedad de Cushing, trauma, embarazo, uso de esteroides o tranquilizantes, las cuales uno de sus signos más importantes es el incremento de peso, lo cual llevará al paciente a sobrepeso y por ultimo a la obesidad.¹⁸

La importancia de la obesidad radica en su alta comorbilidad en relación con otras patologías y otros sistemas del cuerpo humano. El incremento de peso se relaciona con incremento del riesgo cardio-vascular, hiperlipidemia, hipertensión y diabetes.¹⁹ También se relaciona con apnea de sueño, cáncer²⁰, colelitiasis, trastornos músculo esqueléticos²¹, pancreatitis²², panniculitis bacteriana²³, diverticulitis²⁴, infertilidad²⁵, incontinencia urinaria²⁶, hipertensión endocranial idiopática²⁷ y trastornos psicológicos^{28,29}.

Desafortunadamente, no hay una cura para la obesidad. En la actualidad existen varios enfoques para tratar esta patología. Sin embargo, la prevención es la mejor manera de combatir la obesidad con estilos de vida saludables basados en dieta baja en calorías y ejercicio diario cardiovascular. Los tratamientos actuales se los puede clasificar en farmacológicos o quirúrgicos. Los tratamientos farmacológicos actúan de distintas maneras: 1) disminuyen ingesta de comida (Agentes adrenergicos o serotoninergicos); 2) Alteran metabolismo (Agentes Pre o posabsortivos); y 3) Aumentan el gasto calórico. Los tratamientos quirúrgicos o bariátricos actúan como 1) Malabsorptivos (bypass Jejunoileal o Roux – Y: Biliopancreatic diversion y duodenal switch); y 2) Restrictivos (Gastroplasty, Gastric banding o Gastric bypass).³⁰

En las últimas décadas, se han buscado varios nuevos enfoques para tratar o curar a esta patología. Las nuevas terapias se han enfocado en disminuir el tejido adiposo (adiposidad) o en corregir la disfunción de tejido adiposo (adipopatía). Estas nuevas terapias han profundizado nuestros conocimientos sobre la regulación de energía, el Sistema Cerebro - Intestinal y la regulación de la grasa por nuestro organismo³¹.

La regulación de energía es un complejo sistema neuro-hormonal que controla la ingesta calórica y el consumo de energía para lograr mantener un equilibrio energético y de esa manera poder controlar nuestro peso. El balance energético está controlado por un circuito nervioso y un sistema endócrino, los cuales provienen sus impulsos del cerebro, especialmente del hipotálamo. Conformando el eje Hipotálamo – intestinal y el eje hipotálamo –tejido adiposo para el mantener la homeostasis de la energía corporal.^{32,33}

El Hipotálamo, especialmente en núcleo arcuato controla la ingesta de alimentos debido a un sistema de señales sobre almacenamiento calórico en forma de grasa, ingesta de nutrientes y gasto calórico³⁴. Los estímulos periféricos de almacenamiento de energía provienen del tejido adiposo (leptina) y del páncreas (insulina). Por este motivo se genera la sensación de hambre y buscamos comida. Al comer se produce una retroalimentación por la absorción de nutrientes, estímulos neuronales y pépticos intestinales. Los estímulos hormonales, a través del nervio vago, informan sobre la distensión gástrica y la composición química y hormonal del intestino delgado al núcleo solitario del complejo vagal dorsal³⁵. Este estímulo junto con la distensión gástrica producen secreción de hormonas o péptido intestinales como el Glucógeno péptido similar (GLP-1), péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP), Oxintomodulina (OXM), péptido YY (PYY), Colecistokinina (CCK) y polipéptido (PP). Estos péptidos se dirigen al hipotálamo y producen retroalimentación negativa; o sea saciedad. (Gráfico 1)³²

En el hipotálamo, el núcleo arcuato tiene una barrera hematoencefálica semipermeable a diferencia de los otros núcleos, lo cual le permite una fácil estimulación por los péptidos intestinales³⁶. Estos péptidos activan dos vías neuronales del núcleo arcuato. La vía pro-opiomelanocortina (POMC) que produce inhibición del apetito integrada por hormona estimulante de los melanocitos y actúa sobre los receptores melancortina (MC3 y MC4) y por el péptido de transcripción de la estimulación cocainita – anfetaminita (CART), se desconoce su receptor³⁷. La vía del Neuropeptido Y (NPY) que produce estimulación de apetito actúa en los receptores Y (Y1 al Y5) y en péptido agouti que son antagonistas de la actividad de receptores MC3/4³⁸. Además existen un estímulo del cerebro medio especialmente del núcleo del tracto solitario que recibe los impulsos vágales provenientes del tracto gastro intestinal. Y este estímulo se conecta con la corteza,

la amígdala, y los núcleos del tallo cerebral. Controlando de esta manera la ingesta y gasto calórico. (Gráfico 2)^{32, 39}

En la actualidad se han encontrado varios péptidos intestinales que producen saciedad en los seres humanos a través del núcleo arcuato del hipotálamo. Uno de los más importantes en este campo son el péptido YY y la oxintomodulina.

El péptido YY (PYY) pertenece al sistema del neuropéptido Y o a la familia de los neuropéptidos al igual que el neuropeptido Y, y el polipéptido pancreático (PP). El gen del PYY se localiza en el cromosoma 17q21.1 con un gen homólogo (PYY 2) en el cromosoma 17q11. (Gráfico 3)⁴⁰

La síntesis del PYY se origina de una preprohormona (PreproPYY) de 98 aminoácidos (a.a), la cual por medio de una peptidasa se pierde 28 a.a. de extremo amino y se convierte en proPYY. En el aminoácido 39 por medio de una carboxilación dibásica y amidación del extremo carboxilo de la ProPYY, produciéndose PYYGly-Lys-Arg. Luego se produce una amidación. Se produce una segunda amidación en el extremo carboxilo separando la Gly-Lys-Arg, produciendo un péptido de 36 a.a. Luego de su secreción, por medio de la peptidasa dipeptidil IV (DPP_IV) se elimina del extremo amino la Tyr-Pro y se produce el péptido YY3-36. (Gráfico 4)^{41,42}

El PYY se almacena en vesícula en las células L endócrinas del tracto digestivo distal y es secretada 15 minutos después de la ingesta de comida, con un pico a los 60 minutos y se mantiene elevada por 6 horas. Su estimulación es indirecta desde el tracto digestivo proximal por medio de un impulso vagal; y directa por distensión luminal sobre

células L endocrinas. Su secreción esta asociada con la ingesta calórica. La ingesta de grasas aumenta la secreción de PYY y disminuye la secreción de grelina. (Gráfico 5 y 6)^{41,42}

Se han identificado 6 receptores para PYY y PYY3-36. De los cuales, el receptor PYY Y2 es el de mayor importancia en la regulación del mecanismo de saciedad. (Tabla 1)⁴¹

El PYY actúa a nivel del tracto gastrointestinal y a nivel del Sistema Nervioso Central. Luego de ser estimuladas la vesículas de las células L endocrinas, se libera PYY. El PYY inhibe la secreción de jugo gástrico, la secreción pancreática, la secreción intestinal e inhibe la motilidad gastrointestinal, sin alterar el vaciamiento gástrico. (Gráfico 7)⁴³ De esta manera, disminuye la absorción de nutrientes al sistema porta-hepático. Al mismo tiempo en el hipotálamo, especialmente en el núcleo arcuato estimula la vía melanocortin (POMC) por medio del Y2r activando el c-fos e inactiva neuropéptido (NPY) por medio de modulación GABA luego de estimular el receptor Y2r.⁴⁴ (Gráfico 8) De esta manera, inhibe el apetito y estimula la saciedad a nivel del Sistema Nervioso Central^{45,46,47,48}.

El otro péptido intestinal que tiene un rol importante en el control de la saciedad es la oxintomodulina (OXM), la cual es sintetizada a partir una preprohormona, el Preproglucagón de 158 a.a. que se lo encuentra en el páncreas, en el sistema nervioso central (SNC) y en el intestino⁴⁹. En el páncreas del preproglucagón se origina el glucagón, sin embargo, en el SNC y en el intestino se produce la Oxintomodulina. Por medio de una carboxilación el preproglucagón para a ser proglucagón. El cual por medio de la

prohormona convertasa 1 y 2 pasa a ser Glicentin de 69 a.a. El glicentin, por medio de la DPP IV produce oxintomodulina de 33 a.a. y polipeptide relacionado con Glucagón de 30 a.a.⁵⁰.

La oxintomodulina se almacena en gránulos secretores en las células L endocrinas del intestino junto con GLP-1. Se secretan 5-10 minutos después de la ingesta de comida y su vida media es de 45 minutos. La secreción se relaciona probablemente con la hidrólisis de ácidos grasos y se expresa junto al PYY y a la CCK⁵¹.

El mecanismo de acción de la OXM es muy similar al del PYY produciendo saciedad posprandial. A nivel del SNC activa el c-fos del POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo. Hasta el momento se desconoce su receptor específico pero se cree que actúa igual que el receptor del GLP-1.⁵² A nivel del tracto gastro-intestinal inhibe la secreción y motilidad gástrica, suprime a la grelina, disminuye la motilidad duodeno y jeyuno y promueve la secreción de insulina.^{53,54}

Debido a que fisiológicamente el PYY y la OXM producen saciedad, varios estudios clínicos han intentado comprobar su eficacia para disminuir de peso y convertirse en forma de tratamiento para obesidad. Casanova et al. y Bloom et al. han comprobado que la inyección de PYY o PYY3-36 en humanos de peso normal y obesos produce saciedad y disminución de peso. Y Bloom et al. han realizado estudios similares con OXM consiguiendo disminuir la ingesta calórica y una disminución de peso significativa en pacientes obesos.^{55,56,57,58,59,60,61,62} Por lo tanto, se puede concluir que ambas hormonas intestinales pueden convertirse en un futuro tratamiento para la obesidad. Sin embargo, desgraciadamente en todos los estudios clínicos realizados el mecanismo de colocación de

los péptidos en los humanos ha sido por inyecciones intravenosas o subcutáneas preprandiales, produciéndose un alto rechazo al tratamiento.

Con la idea de mejorar la forma de manejar la secreción hormonal para controlar la producción de hormonas intestinales que contribuyan al tratamiento de obesidad, se han buscado nuevos métodos de tratamiento como es la terapia con genes.

La terapia con Genes es el tratamiento de enfermedades que fisiopatológicamente están relacionadas con genes. Al inicio se consideraban solo enfermedades hereditarias. Sin embargo con el pasar del tiempo hemos descubierto que todas las enfermedades se relacionan con los genes, es por eso que ahora la terapia con genes también se enfoca en enfermedades transmisibles y enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad⁶³.

Los mecanismos de la Terapia con Genes consisten en: 1) Reemplazo de genes (fibrosis quística); 2) Supresión de genes (siRNA.- Huntington); 3) Regulación de genes (infarto agudo de miocardio.- FCF1); 4) Suplementación de genes (obesidad) y 5) Eliminación de genes (cáncer)⁶⁴. Por medio de estos mecanismos se han intentado tratar varias enfermedades incurables en los seres humanos.

Para lograr introducir el ADN o RNA en las células se utilizan vectores. Los vectores pueden ser vectores virales (retrovirus, adenovirus, adeno-asociado virus, herpes simple virus) o vectores no virales (liposomas o DNA puro).⁶⁵

Desgraciadamente, la terapia génica ha tenido varios tropiezos importantes en los estudios clínicos por efectos adversos, especialmente causado por los vectores y hasta el

momento ningún estudio clínico ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica. Desde entonces, se ha avanzado mucho en la utilización de vectores para disminuir la respuesta inmune. Al momento, la terapia con genes todavía tiene un futuro muy prominente para el tratamiento de enfermedades incurables⁶⁴.

Objetivos

Esta es una investigación a largo plazo del Powell Gene Therapy Center de la Universidad de Florida y tiene como objetivo principal reducir la obesidad por medio de terapia génica usando péptidos intestinales. Para lograr este objetivo nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos: 1) Hacer una revisión de la literatura sobre obesidad, regulación de energía y péptidos intestinales; 2) Diseñar un gen de PYY y OXM para usarlo junto a un vector para el tratamiento de obesidad; 3) Crear un gen de PYY y uno de OXM; 4) Crear un AAV2-8 con PYY y OXM; 5) Demostrar la secreción de PYY activado, como prepro-hormona (prueba de concepto); 6) Demostrar la infección del gen en las células endocrinas del intestino (prueba de concepto); 7) Disminuir la ingesta de comida en ratas ; 8) Disminuir el peso corporal de las ratas; y 9) Aprobar la fase I, II y III de los estudio clínicos para PYY y OXM con terapia con genes para obesidad.

En esta fase de la investigación se han planteado cumplir los tres primeros objetivos específicos y los siguientes objetivos deberán ser realizados en futuras investigaciones.

Materiales y Métodos:

El Cronograma de trabajo se explica en la siguiente tabla. (Tabla 2)

Tiempo	1	2	3	4	5 - 18	19 - 30	30 - ??
ETAPA (meses)							
Revisión de literatura							
Diseño de Plásmidos							
Crear fragmentos de ADN							
Crear vectores + gen							
Estudios In vitro							
Estudios In vivo							
Estudios Clínicos							

Revisión bibliográfica

Antes de iniciar la investigación, se hizo una revisión de la literatura sobre obesidad, regulación del balance energético, eje hipotálamo – intestinal, péptidos intestinales, terapia génica, clonación de genes, sistema Báculo virus y Vectores virales. Esta revisión se la hizo usando los buscadores Pubmed, Medline y MdConsult. Además se usaron varios textos de consulta específicos de cada tema.

Diseño de plásmidos:

Se diseñó los genes de PYY (preprohormona) y OXM acoplándolos al plásmido de

Baculovirus recombinante (pTR-BAC-OXM/PYY) usando el programa SimVector 4.0.

Secuencia de Oxintomodulina: (Diseño de Gen)

```

HindIII
~~~~~
GTTC AAGCTT TCCAGGGCTC AGGATGGCTA CAGGCTCCCG GACGTCCCTG CTCTGGCTT TTGGCCTGCT CTGCCTGCC TGGCTTCAAG AGGGCAGTGC
CAAGTTCGAA AGGTCGCCGAG TCCTACCGAT GTCCGAGGGC CTGCAGGGAC GAGGACCGAA AACCGGACGA GACGGACGGG ACCGAAGTTC TCCCGTCACG
CCATTCACAG GGCACATTCA CCAGTGACTA CAGCAAATAT CTAGACTCCC GCCGTGCTCA AGATTTTGTG CAGTGGTTGA TGAACACCAA GAGGAACCGG
GGTAAGTGTG CCGTGTAAGT GGTCAGTAT GTCGTTTATA GATCTGAGGG CGGCACGAGT TCTAAAACAC GTCACCAACT ACTTGTGGTT CTCTTTGGCC
Clal
~~~~~
AACCAATTG CCTGATATCG ATGG
TTGTTGTAAC GGAATATAGC TACC

```

Diseño del Plásmido pBS-OXM (Gráfico 10)

Diseño del Plásmido pTR-Bac-OXM (Gráfico 11)

Secuencia de péptido YY: (Diseño de Gen)

```

HindIII                               Sall
~~~~~                               ~~~~~
M V A V R R P W P V M V A M L L V L L A C L G A L V D
CCCAAGCTTC GCCGCCACCA TGGTGGCGGT ACGCAGGCCT TGGCCCGTTA TGGTCGCAAT GCTGCTAGTC CTGCTCGCCT GCCTGGGAGC GCTGGTCGAC
GGGTTGCAAG CGGCGGTGGT ACCACCGCCA TGCGTCCGGA ACCGGGCAAT ACCAGCGTTA CGACGATCAG GACGAGCGGA CGGACCTCG CGACCAGCTG
Nsil                               MluI
~~~~~                               ~~~~~
A Y P A K P E A P G E D A S P E E L S R Y Y A S L R H Y L N L V T R ·
GCCTACCCCG CTA AAC CAGA GGCTCCGGGC GAAGATGCCT CCCCGAGGA GCTGAGCCGC TACTATGCAT CCCTGCCCA CTACCTCAAC CTGGTCACGC
CGGATGGGGC GATTTGGTCT CCGAGGCCCG CTTCTACGGA GGGGCCTCCT CGACTCGGCG ATGATACGTA GGGACGCGGT GATGGAGTTG GACCAGTGC
MluI                               Clal
~~~~~                               ~~~~~
· Q R Y G K R E V P A A L F S K L L F T D D S D N L P F R S R *
GTCAGCGGTA TGGGAAAAGA GAAGTCCCG CAGCTCTGTT CTCCAACCTG CTCTTCACAG ACGACAGCGA TAATCTCCC TTTCAGTCTC GGTAGTAAAT
CAGTCGCCAT ACCCTTTTCT CTTACAGGGC GTCGAGACAA GAGGTTGAC GAGAAGTGTG TGCTGTCGCT ATTAGAGGGG AAGTCCAGAG CCATCATTTA
Clal
~~~~~
CGATGG
GCTACC

```

Diseño del Plásmido pBS-PYY (Gráfico 12)

Diseño del Plásmido pTR-Bac-PYY (Gráfico 13)

Una vez diseñado los respectivos plásmidos para Oxintomodulina y PYY se ordenaron los siguientes primers:

PYY

PYY1HindSal-F

CCCAAGCTTCGCCGCCACCATGGTGGCGGTACGCAGGCCTTGGCCCGTTATGGTCGC

PYY1HindSal-R

GGCGTCGACCAGCGCTCCCAGGCAGGCGAGCAGGACTAGCAGCATTGCGACCATAACGGGC

PYY1SalMlu-F

GCTGGTCGACGCCACCCCGCTAAACCAGAGGCTCCGGGCGAAGATGCCTCCCCGGAGGAGCTGAGCCGC

PYY1SalMlu-R

CGCTGACGCGTGACCAGGTTGAGGTAGTGGCGCAGGGATGCATAGTAGCGGCTCAGCTCCTC

PYY1MluCla-F

GGTCACGCGTCAGCGGTATGGGAAAAGAGAAGTCCCCGAGCTCTGTTCTCCAACTGCTCTTCACAGACG

PYY1MluCla-R

CCATCGATTACTACCGAGACCTGAAGGGGAGATTATCGCTGTCGCTGTGAAGAGCAG

Oxintomodulina

hGH-F

GTTCAAGCTTCCAGGGCTCAGGATGGCTACAGGCTCCCGG

hGH-R

CCTGTGAATGGGCACTGCCCTTTGAAGC

OXM-F

GGCAGTGCCCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAATATCTAGACTCCCGCCGTGCTCAAG

OXM-R

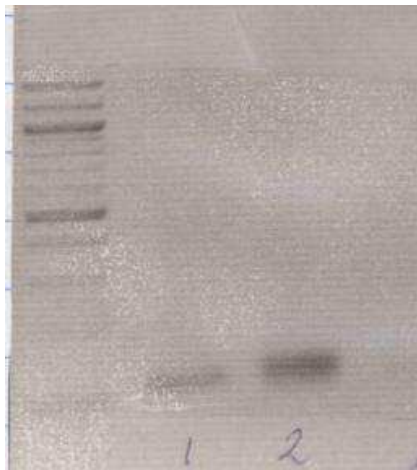
CCATCGATATCAGGCAATGTTGTTCCGGTTCCTCTGGTGTTCATCAACCACTGCACAAAATCTTGAGCACGGCGG

Construcción del gen y los plásmidos:

Los genes fueron construidos usando el protocolo de sobre posición de PCR con Pfu turbo polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Los plásmidos recombinantes fueron construidos usando técnicas estándares de biología molecular.

Resultados:

El gen de OXM se lo creo por la unión de los primers hGH-F con hGH-R y OXM-F con OXM-R con se ve en el grafico del gel de Agarosa 2%, rotulado como 1 y 2 respectivamente.

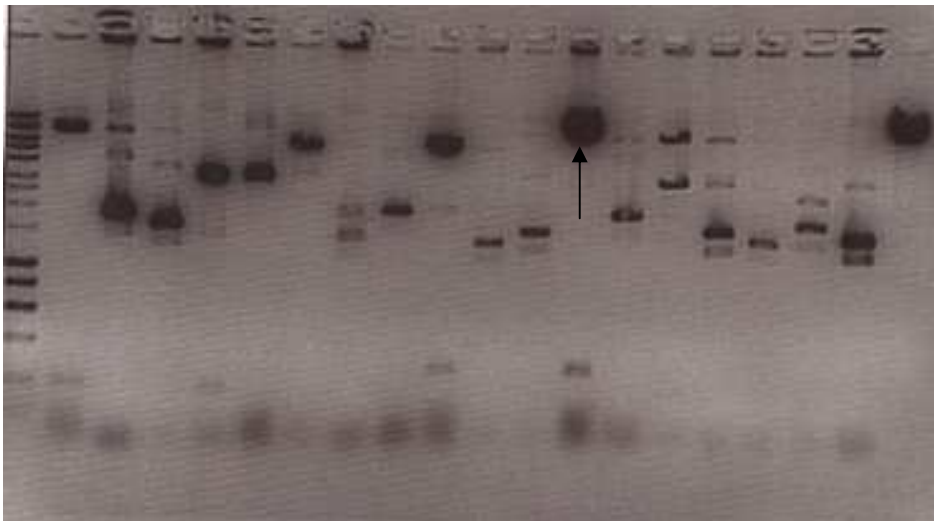


Luego se unió la cadena 1 (hGH-F/hGH-R) con la cadena 2 (OXM-F/OXM-R), se ilustra en el siguiente gel de Agarosa al 2%

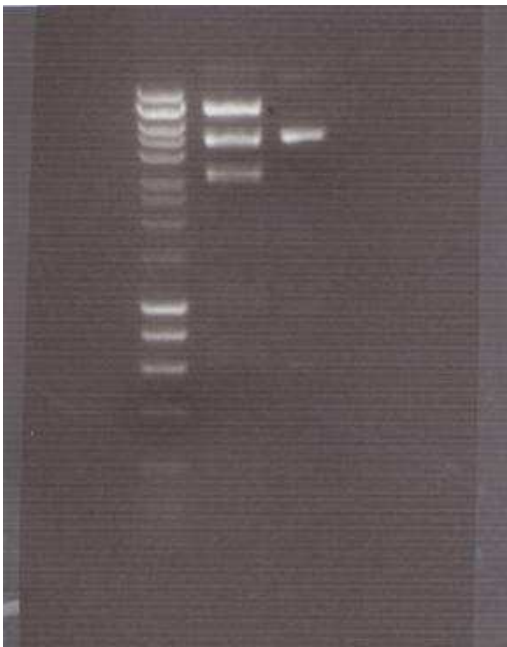


Clonación del Plasmido:

La clonación del Plasmido pBS-OXM fue todo un éxito y se lo demuestra en el siguiente Gel de Agarosa 1%.

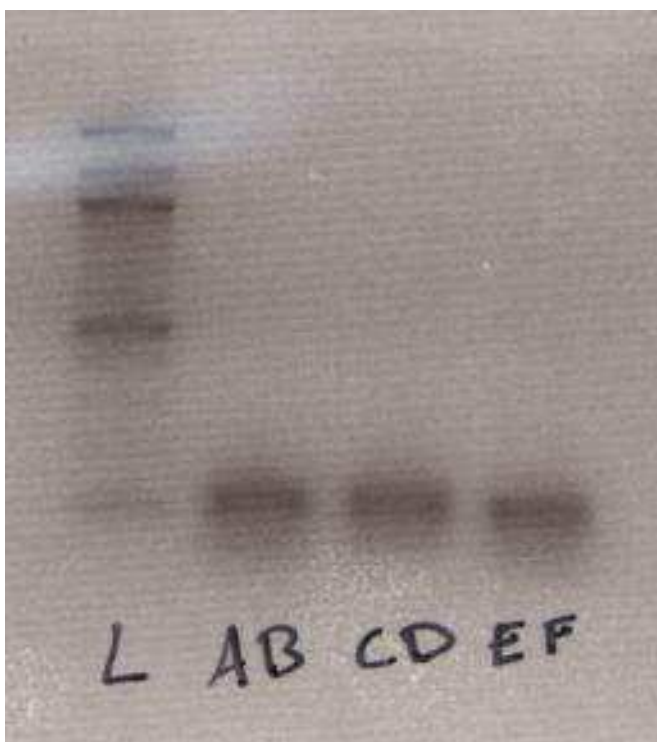


Se cultivo el plasmido en Células E. Coli y se lo clonó en el Plasmido pTR-Bac-OXM, como se ilustra en el siguiente Gel de Agarosa 1% .



PYY DNA

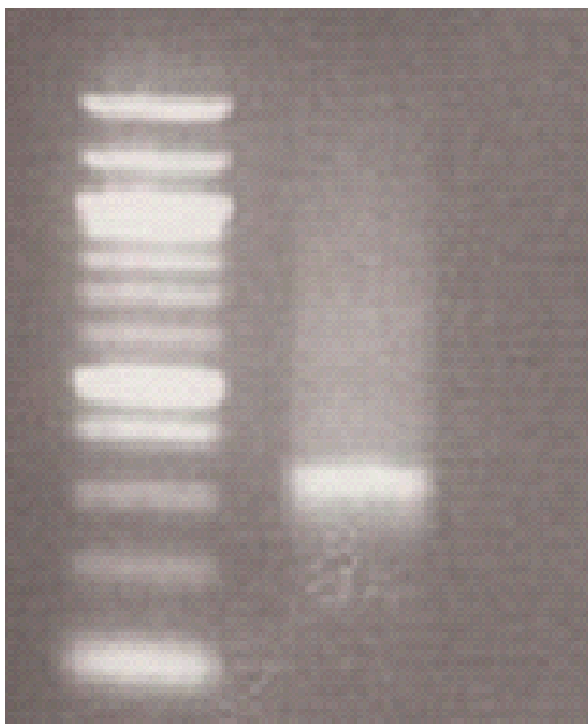
El gen de PYY se lo creo por la unión de los primers PYYHindSal-F con PYYHindSal-R, PYYSalMlu-F con PYYSalMlu-R y PYYMluCla-F con PYYMluCla-R con se ve en el grafico del gel de Agarosa 2%, rotulado como AB, CD y EF respectivamente



Luego se unió la cadena AB con la cadena CD, se ilustra en el siguiente gel de Agarosa al 2%

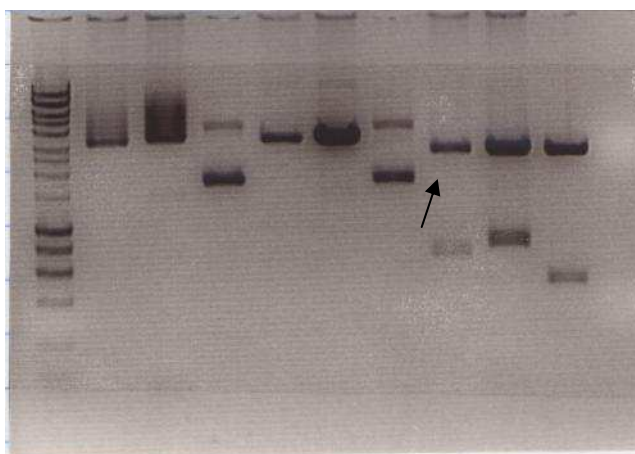


Luego se unió la cadena ABCD con la cadena EF, se ilustra en el siguiente gel de Agarosa al 2%

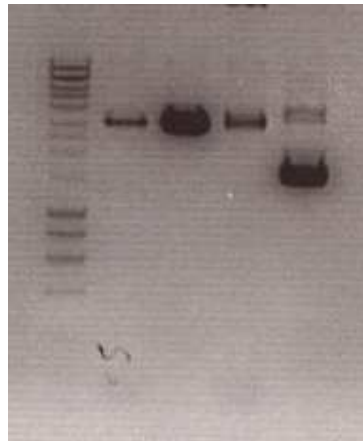


Clonación del Plasmido:

La clonación del Plasmido pBS-PYY fue todo un éxito y se lo demuestra en el siguiente Gel de Agarosa 1%.



Se cultivo el plasmido en Celulas E. Coli y se lo clonó en el Plasmido pTR-Bac-PYY, como se ilustra en el siguiente Gel de Agarosa 1% .



Discusión:

En la presente investigación, se crearon dos plásmidos (pTr-Bac-OXM y pTr-Bac-PYY) los cuales están listos para ser incorporados al vector AAV2/8 por medio del sistema Bac-to-Bac. Una vez que se tenga listo el vector, se estudiará *in Vitro* e *in vivo* la utilidad de la terapia con genes de PYY y OXM para disminuir de peso.

El tratamiento con PYY y OXM por medio de la terapia génica para la obesidad no ha sido estudiado previamente. Esta investigación se suma a una serie de investigaciones de péptidos intestinales --como NPY⁶⁶, leptina,⁶⁷ POMC,⁶⁸ y adiponectina^{69,70} -- para el tratamiento para obesidad.

Sin embargo, ha diferencia de los otros péptidos intestinales, los estudios previos usando PYY u OXM en infusiones continuas, como inyección subcutánea o intravenosa realizados por Bloom et al,^{71,72,73,74,75,76,77,78} han demostrado que ambos péptidos producen saciedad, disminuyen la ingesta calórica y producen disminución de peso en ratas y humanos de peso normal y obesos. El uso de terapia génica con PYY y OXM debería producir el mismo efecto que el demostrado en los estudios previos con estas hormonas.

Otro beneficio del tratamiento con PYY y OXM para la obesidad es que esta terapia no disminuye el apetito y el individuo disfrutaría con igual placer su alimentación. Pero al producir saciedad hace que el individuo ingiera menor cantidad de comida. Al no alterar el apetito se mantiene el placer por comer que es muy importante en nuestras vidas. Entonces, si esta terapia funciona, superaría otras formas de tratamiento para obesidad; especialmente los tratamientos farmacológicos que producen disminución de apetito. Este nueva terapia para la obesidad, tuviera un efecto similar o mayor a los tratamientos bariátricos actuales^{79,80,81}, ya que existen varios estudios como el de Korner et al, que menciona que existe una relación entre la disminución de peso después del Bypass Roux en Y con los péptidos intestinales, especialmente con el PYY.

Sin embargo, para lograr la efectividad de este nuevo tipo de tratamiento para la obesidad usando terapia con genes, primero debemos resolver algunas limitantes de la terapia con genes como menciona Sergei Zolotukhin en su revisión Obesity.- Future treatments⁸². Estas limitantes actuales, que luego serán ventajas son la expresión de los genes de manera prolongada, disminuir la patogenicidad de los vectores, su habilidad para infectar distintas células y un mejor diseño de los vectores para insertar péptidos.

En el presente estudio tuve varias limitaciones debido a la falta de conocimientos específicos sobre el tema de la investigación y sobre este nuevo tipo de tratamiento. Sugiero que se agregue un modulo de genética y biología molecular al pensum de medicina. Otra limitación fue el poco tiempo destinado para realizar la investigación debido a que la misma tuvo que ser realizada en la Universidad de Florida, ya que nuestra Universidad no cuenta con los fondos necesarios para realizar este tipo de investigaciones. Sin embargo, por más que conté con los fondos necesarios para realizar esta investigación; desgraciadamente en la ciencia todavía existe mucho de casualidad y muchas veces los protocolos no son exactos, entonces toca perfeccionar la técnica o el protocolo para obtener los resultados deseados.

Dentro de las fortalezas que tiene esta investigación es la de proponer un nuevo tratamiento para una epidemia de los países desarrollados que también afecta a los países en vías de desarrollo. Existe un gran futuro si se logran cumplir los objetivos propuestos de toda esta investigación, pero mientras tanto se debe ir puliendo los detalles y aprobando cada uno de los objetivos. Por suerte, para continuar en esta investigación se cuenta con los fondos necesarios.

Anexos:

Lista de Gráficos:

1. Eje hipotálamo – intestinal	Pág. 38
2. Regulación de Ingesta Calórica y Metabolismo energético	Pág. 39
3. Cromosoma 17 y PYY	Pág. 40
4. Síntesis de PYY	Pág. 41
5. Secreción de PYY	Pág. 42
6. Células L endocrinas del Intestino Delgado, donde secretan PYY	Pág. 43
7. Mecanismo de acción a nivel intestinal de PYY	Pág. 44
8. Sistema Hipotalámico de control de ingesta y consume energético	Pág. 45
9. Síntesis de OXM	Pág. 46
10. Plasmido pBS- OXM	Pág. 47
11. Plasmido pTR-Bac-OXM	Pág. 48
12. Plasmido pBS- PYY	Pág. 49
13. Plasmido pTR-Bac-PYY	Pág. 50

Gráfico 1: Eje hipotálamo – intestinal

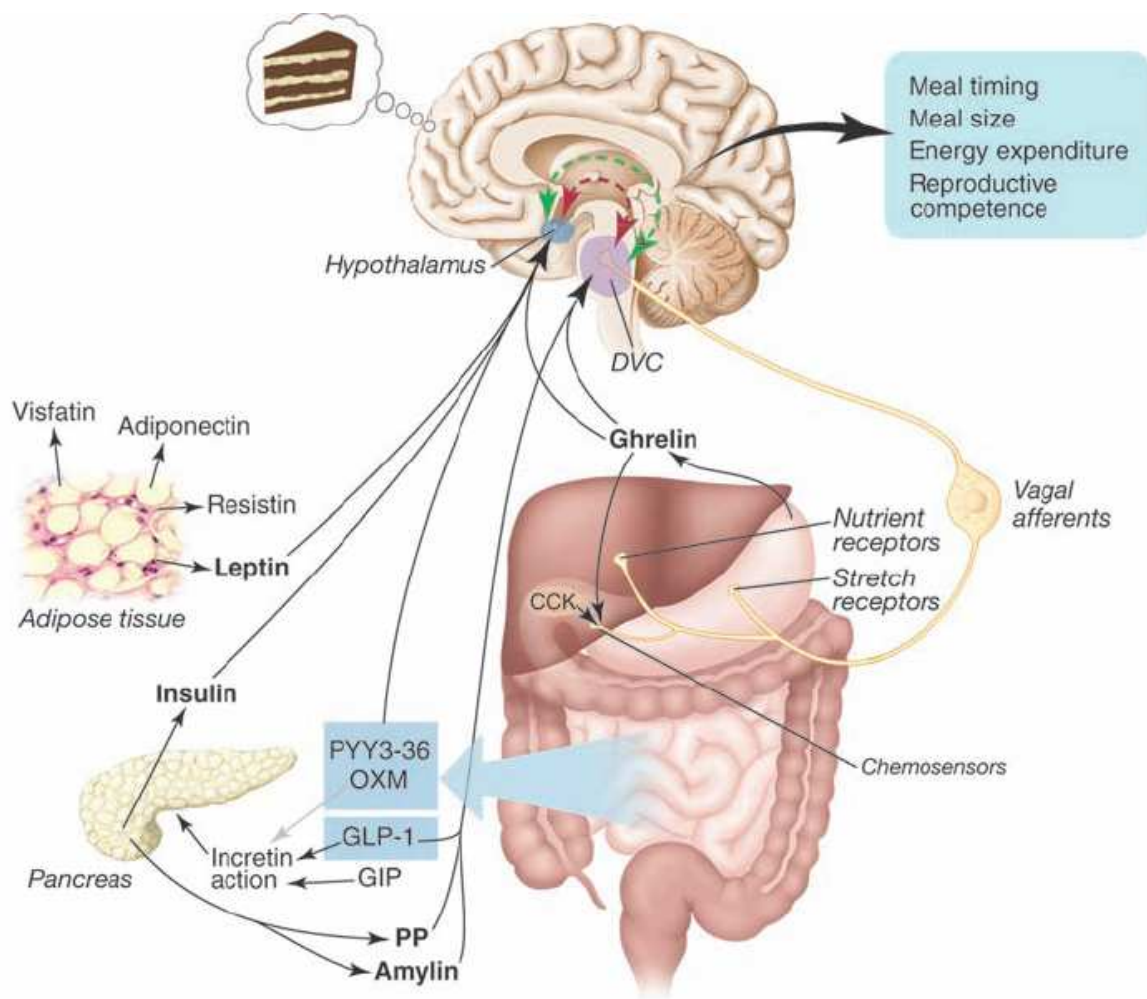


Gráfico 2: Regulación de Ingesta Calórica y Metabolismo energético

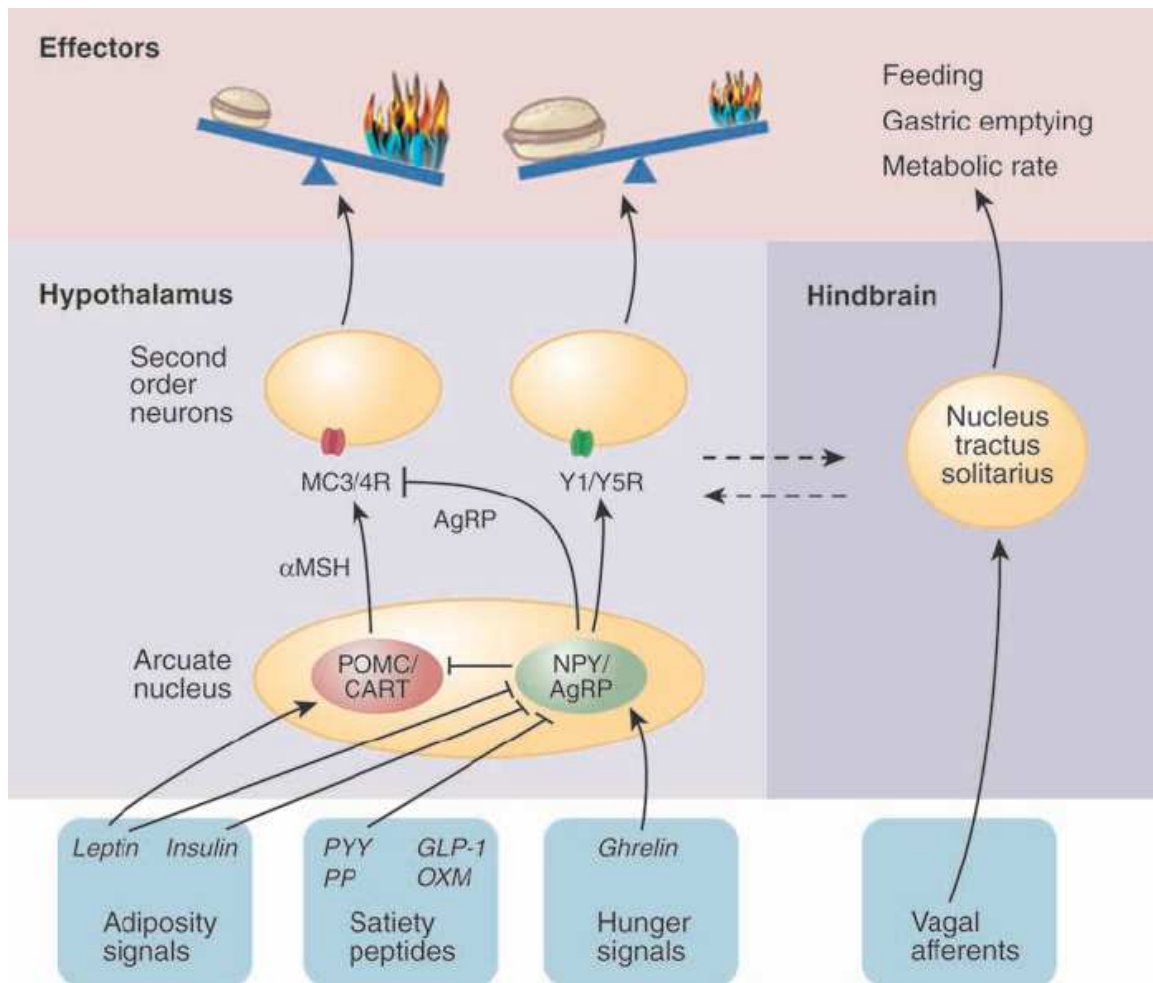


Gráfico 3: Cromosoma 17 y PYY

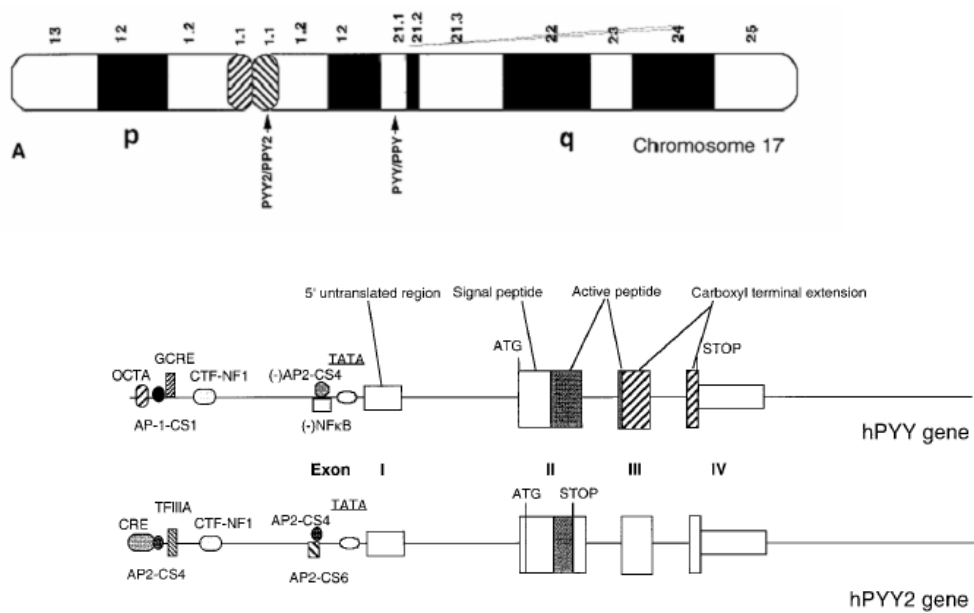


FIG. 1. Schematic representation of the exon/intron organization of the human PYY and PYY2 genes. The positions of consensus sequences for several transcription factor binding sites found in the 5' upstream region of the genes are shown.

Gráfico 4: Síntesis de PYY

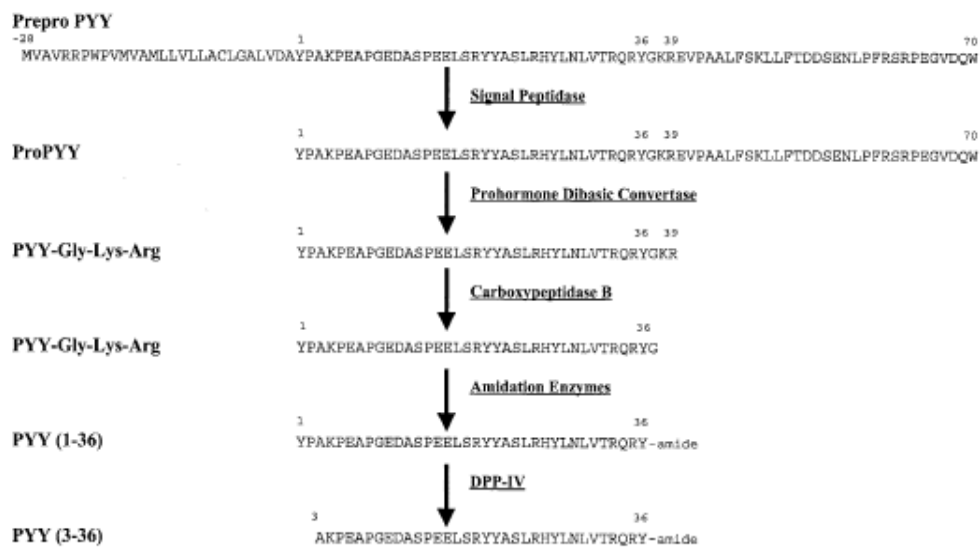


Gráfico 5: Secreción de PYY

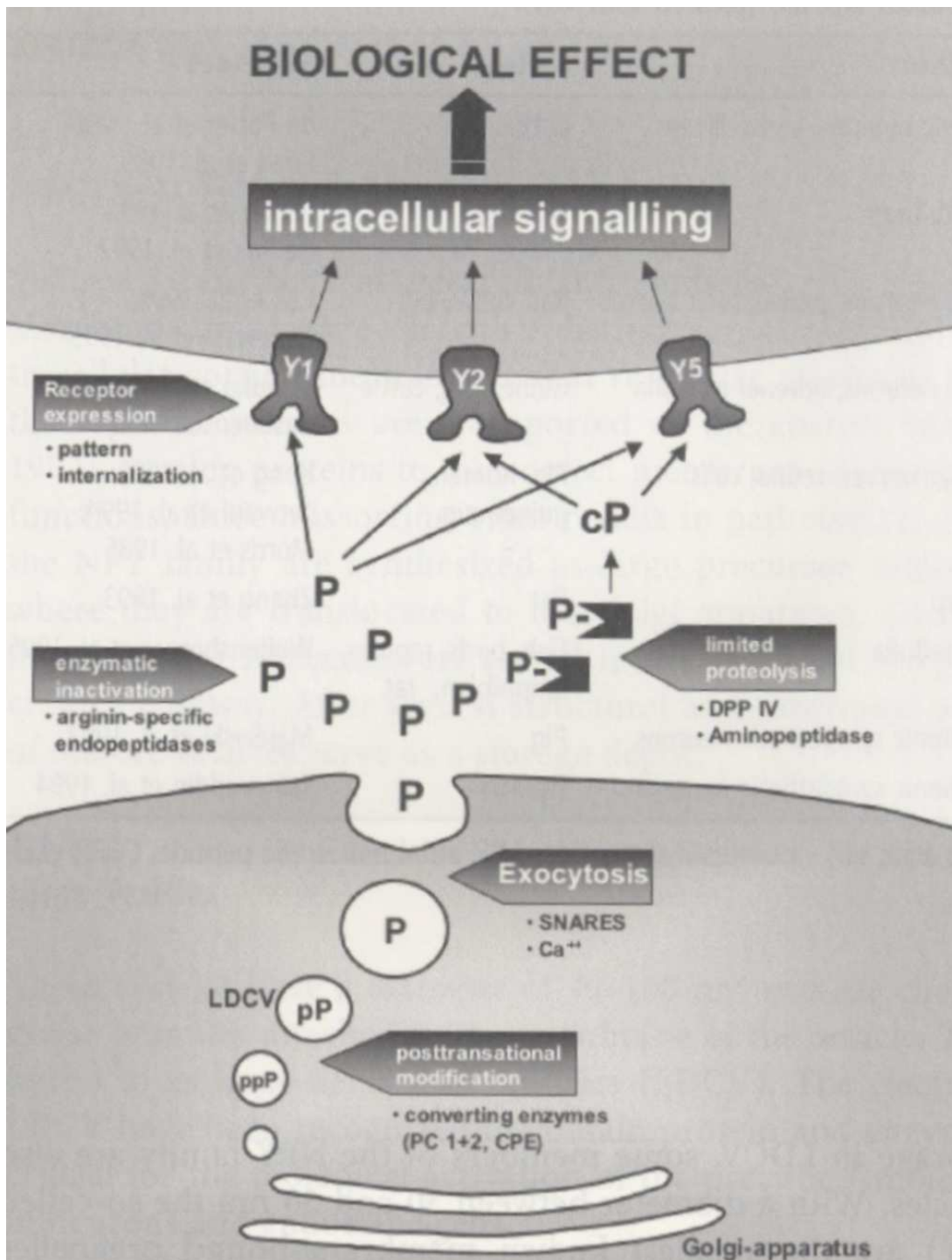
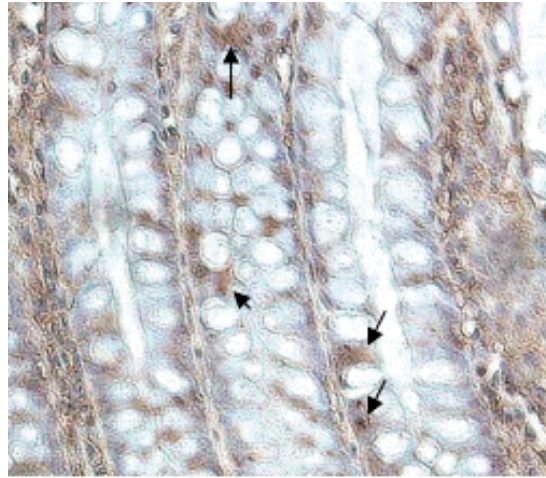


Gráfico 6: Células L endocrinas del Intestino Delgado, donde secretan PYY



Rat colon was stained by Anti-PYY (Human) Serum
(Catalog No. H-059-01)

Gráfico 7: Mecanismo de acción a nivel intestinal de PYY

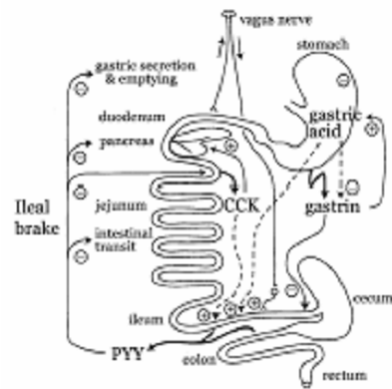


Gráfico 8: Sistema Hipotalámico de control de ingesta y consume energético

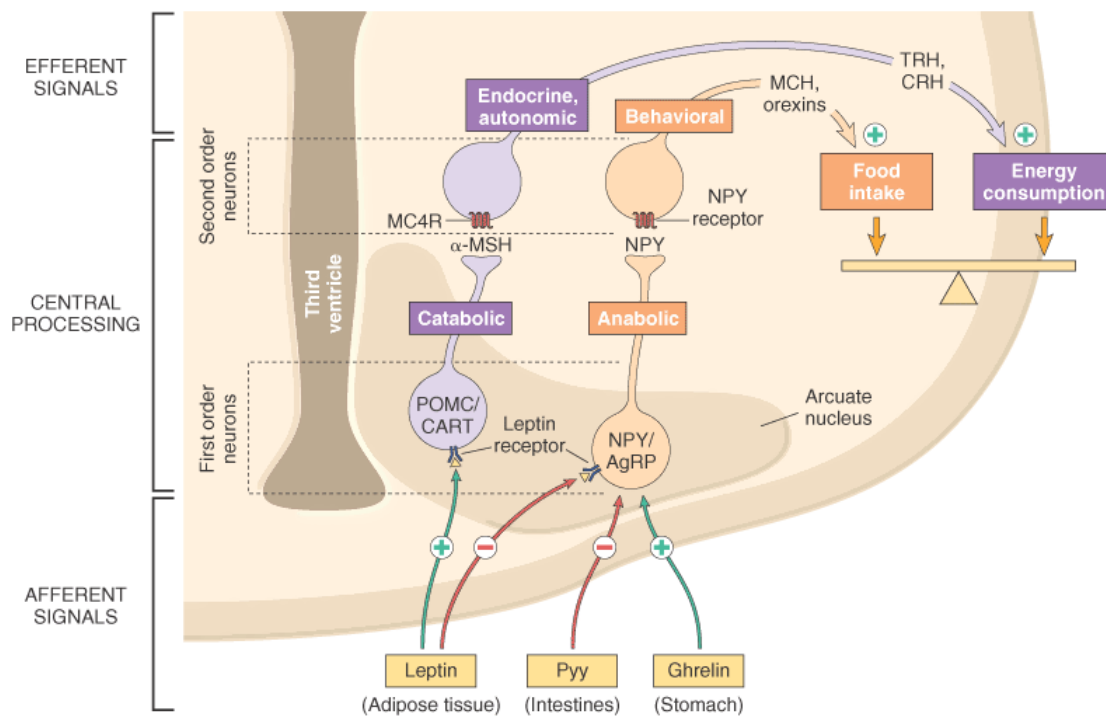


Gráfico 9: Síntesis de OXM

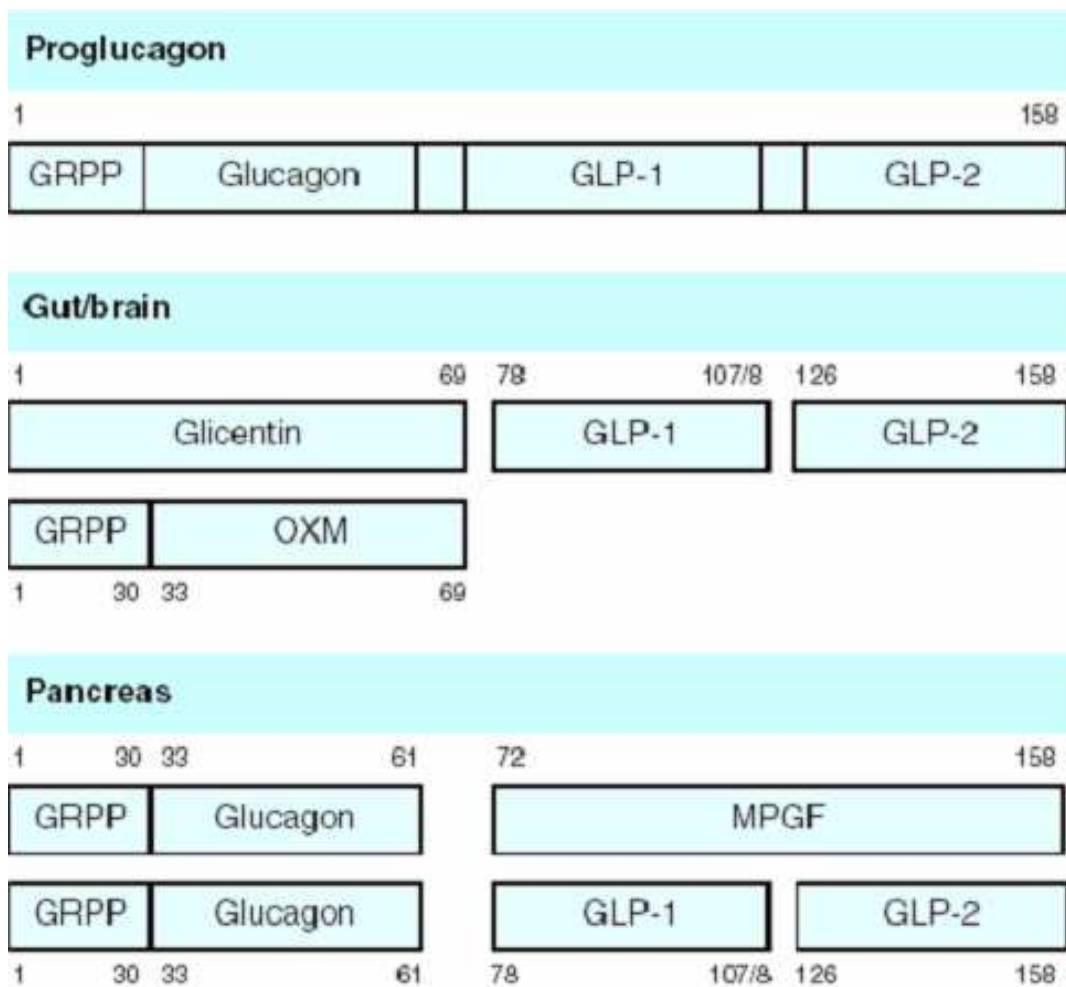


Gráfico 10: Plasmido pBS- OXM

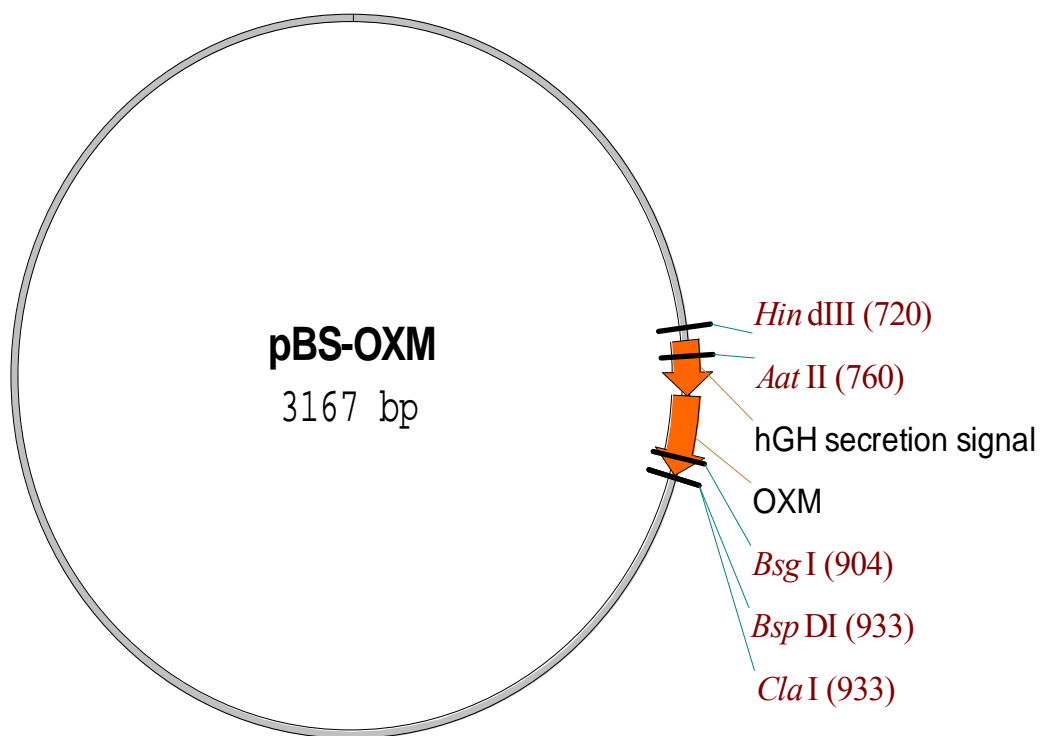


Gráfico 11: Plasmido pTR-Bac-OXM

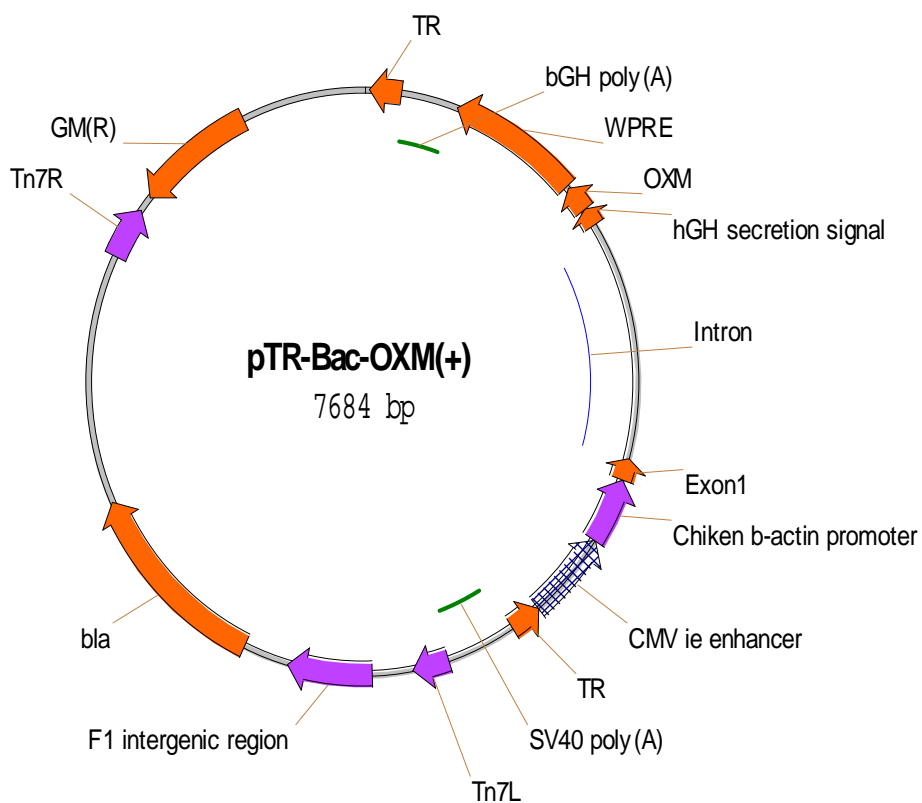


Gráfico 12: Plasmido pBS- PYY

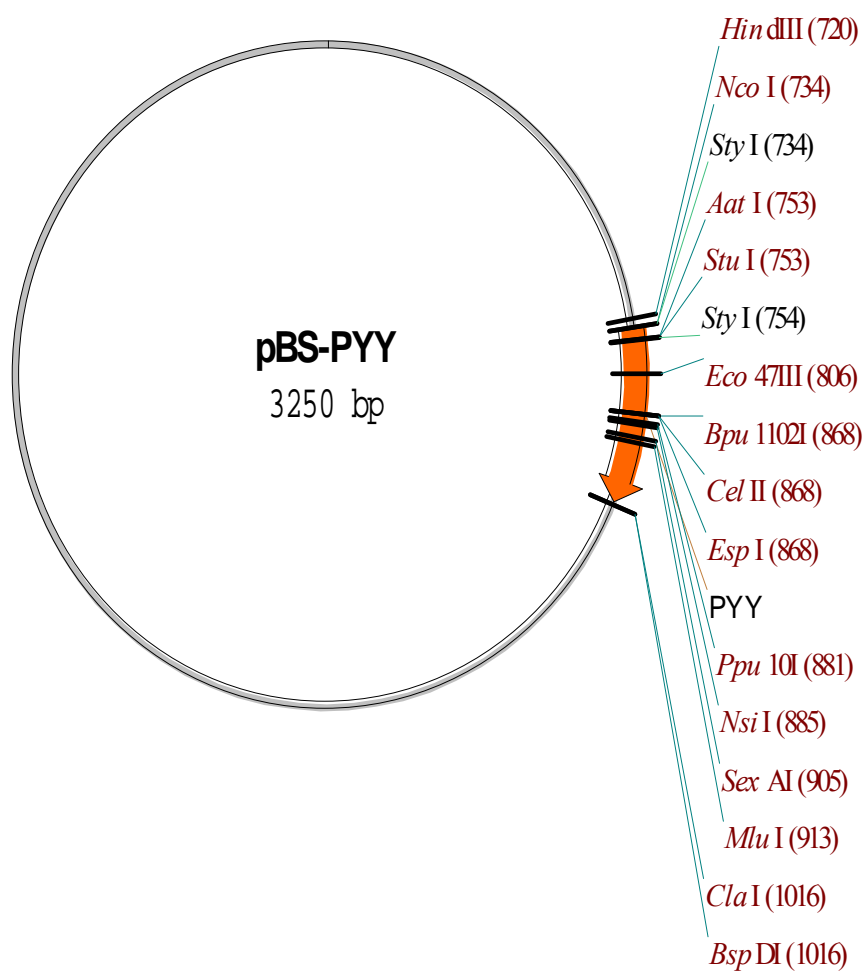
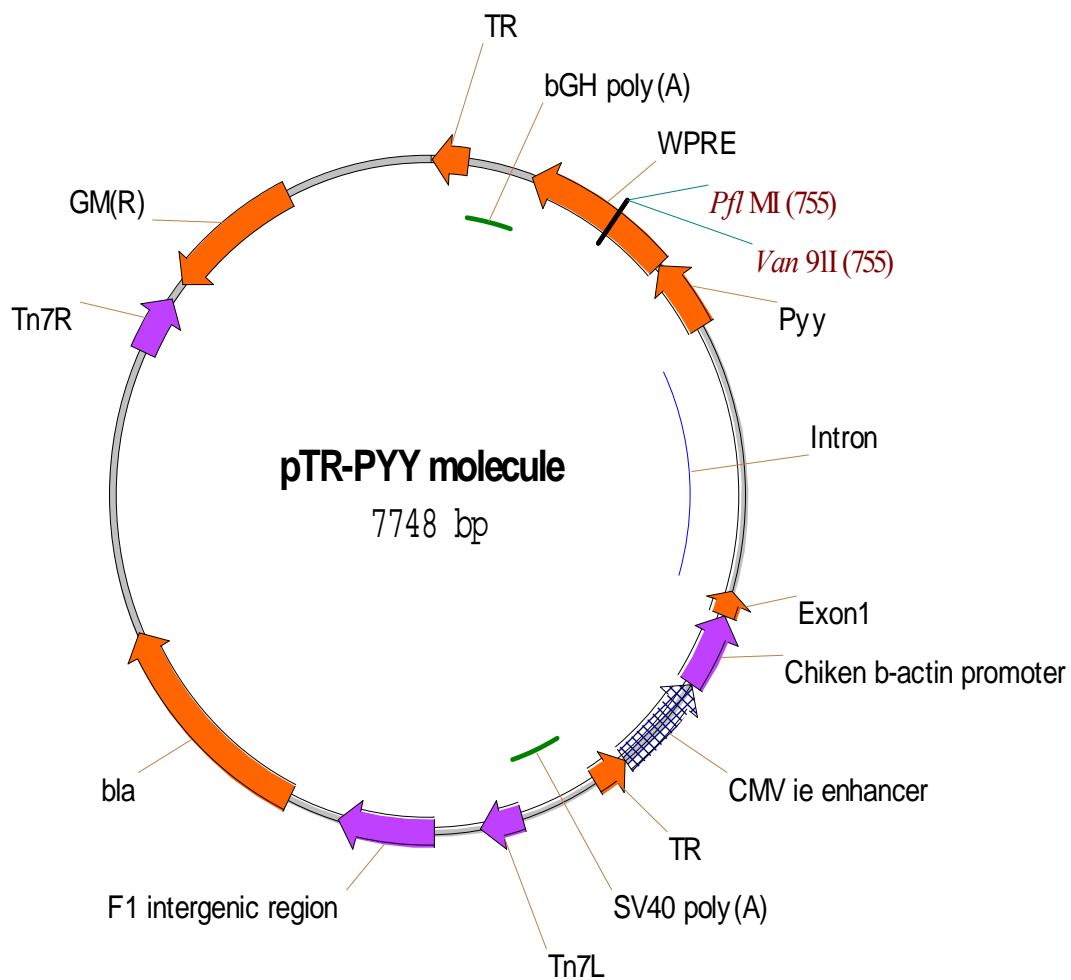


Gráfico 13: Plasmido pTR-Bac-PYY



Lista de Tablas

1. Receptores de PYY Pág. 52
2. Cronograma de Trabajo Pág. 54

Tabla 1: Receptores de PYY

Receptor	Localización	acción
PYY rY1	Cerebro: corteza, núcleo dentado, tálamo e hipotálamo Periferia: venas y arterias	Vasoconstricción Anxiolysis / sedición crecimiento del epitelio colonico
PYY rY2	Cerebro: hipotálamo y medula espinal, fibras de nervios simpáticos y parasimpáticos Intestino Periferia: venas y arterias	Estimula la saciedad Disminuye la absorción de carbohidratos Inhibe la actividad mucociliar Inhibe la vasoconstricción Regula la motilidad del intestino delgado Disminuye el glutamato y la noradrenalina
PYY rY4	Cerebro: hipotálamos, núcleo solitario, área postrema y núcleo paraventricular Tracto gastrointestinal, páncreas, corazón, arterias,	inhibición de la secreción pancreática inhibición de la contracción vesicular Estimulación de liberación de LH y FSH
PYY rY5	Cerebro: hipocampos y núcleo dentado	modulador de la alimentación Actividad anti epiléptica Atenúa síntomas de dependencia de morfina Incentiva la diuresis y natriuresis
PYY rY6	Cerebro: corteza, núcleo dentado, tálamo e hipotálamo Periferia: venas y arterias	?

Tabla 2: Cronograma de Trabajo

Tiempo	1	2	3	4	5 - 18	19 - 30	30 - ??
ETAPA (meses)							
Revisión de literatura							
Diseño de Plasmidos							
Crear fragmentos de ADN							
Crear vectores + gen							
Estudios In vitro							
Estudios In vivo							
Estudios Clínicos							

Referencia Bibliográfica:

1. Isabel Ferreira, Marieke B. Snijder, Jos W. R. Twisk, Willem Van Mechelen, Han C. G. Kemper, Jacob C. Seidell, And Coen D. A. Stehouwer Central Fat Mass Versus Peripheral Fat and Lean Mass: Opposite (Adverse Versus Favorable) Associations with Arterial Stiffness? The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study *J Clin Endocrinol Metab*, June 2004, 89(6):2632–2639
2. Susan L. Polk, MD, mscd Definitions and Demographics of Obesity: Diagnosis and Risk Factors *Anesthesiology Clin N Am* 23 (2005) 397– 403
3. Cynthia L. Ogden, phd*, Margaret D. Carroll, MSPH, Katherine M. Flegal, phd Epidemiologic trends in overweight and obesity *Endocrinol Metab Clin N Am* 32 (2003) 741–760
4. David E. Cummings, Joost Overduin, And Karen E. Foster-Schubert Gastric Bypass for Obesity: Mechanisms of Weight Loss and Diabetes Resolution *J Clin Endocrinol Metab*, June 2004, 89(6):2608–2615 2609
5. Zhaoping Li, MD, phda,*, Susan Bowerman, MS, rdb, David Heber, MD, phd Health Ramifications of the Obesity Epidemic *Surg Clin N Am* 85 (2005) 681–701
6. GEORGE A. BRAY, Medical Consequences of Obesity *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Volume 89 • Number 6 • June 2004
7. Antony D. Karelis, David H. St-Pierre, Florence Conus, Remi Rabasa-Lhoret, And Eric T. Poehlman Metabolic And Body Composition Factors in Subgroups of Obesity: What Do We Know? *J Clin Endocrinol Metab*, June 2004, 89(6):2569–2575
8. Donald W. Richardson, Aaron I. Vinik, Metabolic Implications of Obesity: Before and After Gastric Bypass *Gastroenterol Clin N Am* 34 (2005) 9–24
9. Patrick J. Neligan, Williams, MD Nonsurgical and Surgical Treatment of Obesity *Anesthesiology Clin N Am* 23 (2005) 501– 523
10. James O. Hill, Vicki Catenacci, Holly R. Wyatt, Obesity: Overview of an Epidemic *Psychiatr Clin N Am* 28 (2005) 1–23
11. Kenneth F. Kuchta, Pathophysiologic Changes of Obesity *Anesthesiology Clin N Am* 23 (2005) 421– 429
12. Lee M. Kaplan, Pharmacological Therapies for Obesity *Gastroenterol Clin N Am* 34 (2005) 91–104
13. Anthony P. Coll, I. Sadaf Farooqi, Benjamin G. Challis, Giles S. H. Yeo, And Stephen O’rahilly Proopiomelanocortin and Energy Balance: Insights from Human and Murine Genetics *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(6):2557–2562
14. George A. Bray, MD, Risks of obesity *Prim Care Clin Office Pract* 30 (2003) 281–299
15. Cynthia J. Stein, Graham A. Colditz The Epidemic of Obesity *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Volume 89 • Number 6 • June 2004
16. Robert F. Kushner, The office approach to the obese patient *Prim Care Clin Office Pract* 30 (2003) 327–340
17. Kershaw , Flier. Adipose Tissue as an Endocrine Organ *J Clin Endocrinol Metab*, June 2004, 89(6):2548–2556

18. Michael K. Badman and Jeffrey S. Flier The Gut and Energy Balance: Visceral Allies in the Obesity Wars *SCIENCE* VOL 307 25 MARCH 2005
19. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Jul 29;361(1471):1187-209
20. Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):596-600.
21. Banks wadenial versus dualism: the blood-brain barrier as an interface of the gut-brain axis *Endocrinology.* 2006 Jun;147(6):2611-5.
22. Sobocki J, Krolczyk G, Herman RM, Matyja A, Thor PJ. Influence of vagal nerve stimulation on food intake and body weight - results of experimental studies. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Dec;56 Suppl 6:27-33
23. Wortley KE, del Rincon JP, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3573-8
24. Angelopoulos N, Goula A, Tolis G. Current knowledge in the neurophysiologic modulation of obesity. *Metabolism.* 2005 Sep;54(9):1202-17
25. Popovic V, Duntas LH. Brain somatic cross-talk: ghrelin, leptin and ultimate challengers of obesity *Nutr Neurosci.* 2005 Feb;8(1):1-5
26. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar;55(1 Pt 2):137-54
27. Allescher HD Further extension of the brain-gut axis? *Neurogastroenterol Motil.* 2003 Jun;15(3):239-42.
28. Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):948-53
29. Kirchgessner AL Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):1-15
30. Travagli RA, Rogers RC Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. V. Fast and slow extrinsic modulation of dorsal vagal complex circuits *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Sep;281(3):G595-601
31. Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, Cranford J, Mulloy AL, Cameron R, Isales CM. Glucose-dependent insulinotropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects *Mol Cell Endocrinol.* 2001 May 25;177(1-2):35-41
32. Hornby PJ. Receptors and transmission in the brain-gut axis. II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jun;280(6):G1055-60
33. Aziz Q, Thompson DG. Brain-gut axis in health and disease *Gastroenterology.* 1999 Jan;116(1):227-8
34. Stanley S, Wynne K, mcgowan B, Bloom S. Hormonal Regulation of Food Intake, *Physiol Rev* 85:1131-1158, 2005.
35. Woods S, Seeley R, Porte D, Schwartz M Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis *SCIENCE*, VOL. 280, 1998
36. Wynne K, Stanley S, Bloom S, The Gut and Regulation of Body Weight *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* Volume 89 • Number 6 • June 2004

37. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Jul 29;361(1471):1187-209
38. Banks WA. Denial versus dualism: the blood-brain barrier as an interface of the gut-brain axis *Endocrinology.* 2006 Jun;147(6):2609-10
39. Kellow JE, Azpiroz F, Delvaux M, Gebhart GF, Mertz HR, Quigley EM, Smout AJ. Applied principles of neurogastroenterology: physiology/motility sensation. *Gastroenterology.* 2006 Apr;130(5):1412-20
40. Filaretova L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection *Auton Neurosci.* 2006 Apr 30;125(1-2):86-93. Epub 2006 Feb 14
41. Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):304-11
42. Sobocki J, Krolczyk G, Herman RM, Matyja A, Thor PJ. Influence of vagal nerve stimulation on food intake and body weight - results of experimental studies. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Dec;56 Suppl 6:27-33
43. Wortley KE, del Rincon JP, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3573-8
44. Angelopoulos N, Goula A, Tolis G. Current knowledge in the neurophysiologic modulation of obesity *Metabolism.* 2005 Sep;54(9):1202-17
45. Popovic V, Duntas LH. Brain somatic cross-talk: ghrelin, leptin and ultimate challengers of obesity *Nutr Neurosci.* 2005 Feb;8(1):1-5
46. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar;55(1 Pt 2):137-54
47. Konturek SJ, Pawlik WW, Dajani EZ. Brain-gut axis in gastrointestinal system: Introductory remarks *J Physiol Pharmacol.* 2003 Dec;54 Suppl 4:3-7
48. Allescher HD. Further extension of the brain-gut axis? *Neurogastroenterol Motil.* 2003 Jun;15(3):243
49. Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):948-53. Epub 2003 May 15
50. Kirchgessner AL. Orexins in the brain-gut axis *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):1-15
51. Travagli RA, Rogers RC. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. V. Fast and slow extrinsic modulation of dorsal vagal complex circuits *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Sep;281(3):G595-601
52. Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, Cranford J, Mulloy AL, Cameron R, Isaacs CM. Glucose-dependent insulinotropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects *Mol Cell Endocrinol.* 2001 May 25;177(1-2):35-41
53. Hornby PJ. Receptors and transmission in the brain-gut axis. II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jun;280(6):G1055-60
54. Kirkup AJ, Brunnsden AM, Grundy D. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. I. Receptors on visceral afferents *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 May;280(5):G787-94

55. McLaughlin J. The brain-gut axis in health and disease *J R Coll Physicians Lond.* 2000 Sep-Oct;34(5):475-7
56. Aziz Q, Thompson DG. Brain-gut axis in health and disease *Gastroenterology.* 1998 Mar;114(3):559-78
57. Schioth HB. G protein-coupled receptors in regulation of body weight *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006 Jun;5(3):241-9
58. Wynne K, Park AJ, Small CJ, Meeran K, Ghatei MA, Frost GS, Bloom SR. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial *Int J Obes (Lond).* 2006 Apr 18
59. Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek PC. Neuro-hormonal control of food intake; basic mechanisms and clinical implications *J Physiol Pharmacol.* 2005 Dec;56 Suppl 6:5-25
60. Abbott CR, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JR, Broadhead LL, Ghatei MA, Bloom SR. The importance of acclimatisation and habituation to experimental conditions when investigating the anorectic effects of gastrointestinal hormones in the rat *Int J Obes (Lond).* 2006 Feb;30(2):288-92
61. Small CJ, Bloom SR. The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity *Expert Opin Investig Drugs.* 2005 May;14(5):647-53
62. Bloom S, Wynne K, Chaudhri O. Gut feeling--the secret of satiety? *Clin Med.* 2005 Mar-Apr;5(2):147-52
63. Dhillon WS, Bloom SR. Gastrointestinal hormones and regulation of food intake *Horm Metab Res.* 2004 Nov-Dec;36(11-12):846-51
64. Small CJ, Bloom SR. Gut hormones as peripheral anti obesity targets *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004 Oct;3(5):379-88
65. Small CJ, Bloom SR. Gut hormones and the control of appetite *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Aug;15(6):259-63
66. Pellissier S, Sasaki K, Le-Nguyen D, Bataille D, Jarrousse C. Oxyntomodulin and glicentin are potent inhibitors of the fed motility pattern in small intestine *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Aug;16(4):455-63
67. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure *Gastroenterology.* 2004 Aug;127(2):546-5
68. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones in the control of appetite *Exp Physiol.* 2004 Sep;89(5):507-16. Epub 2004 Jun 7
69. Wynne K, Stanley S, Bloom S. The gut and regulation of body weight : *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2576-8
70. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar;55(1 Pt 2):137-54
71. Stanley S, Wynne K, Bloom S. Gastrointestinal satiety signals III. Glucagon-like peptide 1, oxyntomodulin, peptide YY, and pancreatic polypeptide *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 May;286(5):G693-7
72. Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Minireview: Gut peptides regulating satiety *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2660-5. Epub 2004 Mar 24

73. Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei A, Bloom SR. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2687-95. Epub 2004 Mar 4
74. Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Oct;88(10):4696-701
75. Larsen PJ, Vrang N, Tang-Christensen M. Central pre-proglucagon derived peptides: opportunities for treatment of obesity *curr Pharm Des*. 2003;9(17):1373-82
76. Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, Sinha Roy R. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38) *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22418-23. Epub 2003 Apr 10
77. Dakin CL, Small CJ, Park AJ, Seth A, Ghatei MA, Bloom SR. Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Dec;283(6):E1173-7. Epub 2002 Jul 30
78. Dakin CL, Gunn I, Small CJ, Edwards CM, Hay DL, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat *Endocrinology*. 2001 Oct;142(10):4244-50
79. Anini Y, Jarrousse C, Chariot J, Nagain C, Yanaihara N, Sasaki K, Bernad N, Le Nguyen D, Bataille D, Roze C. Oxyntomodulin inhibits pancreatic secretion through the nervous system in rats *Pancreas*. 2000 May;20(4):348-60
80. Rodier G, Magous R, Mochizuki T, Bali JP, Bataille D, Jarrousse C. A target cell to oxyntomodulin and glicentin: the antral smooth muscle cell *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Dec 11;865:458-62
81. Rodier G, Magous R, Mochizuki T, Le Nguyen D, Martinez J, Bali JP, Bataille D, Jarrousse C. Glicentin and oxyntomodulin modulate both the phosphoinositide and cyclic adenosine monophosphate signaling pathways in gastric myocytes *Endocrinology*. 1999 Jan;140(1):22-8
82. Beauclair F, Eto B, Pansu D, Rodier G, Mochizuki T, Martinez J, Bataille D, Jarrousse C. Oxyntomodulin reduces hydromineral transport through rat small intestine *Dig Dis Sci*. 1998 Aug;43(8):1814-23
83. Rodier G, Magous R, Mochizuki T, Martinez J, Nguyen DL, Bali JP, Bataille D, Jarrousse C. Effect of glicentin, oxyntomodulin and related peptides on isolated gastric smooth muscle cells *Pflugers Arch*. 1997 Nov;434(6):729-34
84. Stumpel F, Scholtka B, Jungermann K. A new role for enteric glucagon-37: acute stimulation of glucose absorption in rat small intestine *FEBS Lett*. 1997 Jun 30;410(2-3):515-9
85. Collie NL, Zhu Z, Jordan S, Reeve JR Jr. Oxyntomodulin stimulates intestinal glucose uptake in rats *Gastroenterology*. 1997 Jun;112(6):1961-70
86. Lloyd KC, Amirmoazzami S, Friedik F, Heynio A, Solomon TE, Walsh JH. Candidate canine enterogastrones: acid inhibition before and after vagotomy *Am J Physiol*. 1997 May;272(5 Pt 1):G1236-42
87. Ben-Hamida A, Houssein AA, Man WK, Spencer J. In vitro effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide, oxyntomodulin, vasoactive intestinal peptide and somatostatin on gastric acid and pepsinogen secretion *Inflamm Res*. 1997 Mar;46 Suppl 1:S105-6
88. Holst JJ. Enteroglucagon *Annu Rev Physiol*. 1997;59:257-71

89. Carles-Bonnet C, Martinez J, Jarrousse C, Aumelas A, Niel H, Bataille D. H-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-OH is the minimal active structure of oxyntomodulin Peptides. 1996;17(3):557-61
90. Collie NL, Walsh JH, Wong HC, Shively JE, Davis MT, Lee TD, Reeve JR Jr. Purification and sequence of rat oxyntomodulin Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Sep 27;91(20):9362-6
91. Jarrousse C, Carles-Bonnet C, Niel H, Bataille D. Activity of oxyntomodulin on gastric acid secretion induced by histamine or a meal in the rat Peptides. 1994;15(8):1415-20
92. Bado A, Cloarec D, Moizo L, Laigneau JP, Bataille D, Lewin MJ. Neurotensin and oxyntomodulin-(30-37) potentiate PYY regulation of gastric acid and somatostatin secretions Am J Physiol. 1993 Jul;265(1 Pt 1):G113-7
93. Le Quellec A, Kervran A, Blache P, Ciurana AJ, Bataille D. Oxyntomodulin, a new hormonal marker of intestinal malabsorption syndromes Rev Med Interne. 1993;14(10):982
94. Feletou M, Galizzi JP, Levens NR. NPY receptors as drug targets for the central regulation of body weight CNS Neurol Disord Drug Targets. 2006 Jun;5(3):263-74
95. Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C,
96. Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction mol Cell Endocrinol. 2006 Jun 5
97. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part II. Changes after gastrointestinal surgery and bariatric surgery. (Part I. Distribution, release and actions -- appeared in the last issue (May 2006)) Obes Surg. 2006 Jun;16(6):795-803
98. Stratis C, Alexandrides T, Vagenas K, Kalfarentzos F. Ghrelin and peptide YY levels after a variant of biliopancreatic diversion with Roux-en-Y gastric bypass versus after colectomy: a prospective comparative study Obes Surg. 2006 Jun;16(6):752-8
99. Zhou J, Hegsted M, mcutcheon KL, Keenan MJ, Xi X, Raggio AM, Martin RJ. Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut Obesity (Silver Spring). 2006 Apr;14(4):683-9
100. Rozengurt N, Wu S, Chen MC, Huang C, Sternini C, Rozengurt E. Co-localization of the {alpha} subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 May 25
101. Bacha F, Arslanian SA. Ghrelin and PYY in Youth: are there Race-related Differences? J Clin Endocrinol Metab. 2006 May 23
102. Murray CD, le Roux CW, Gouveia C, Bassett P, Ghatei MA, Bloom SR, Emmanuel AV, Gabe SM. The effect of different macronutrient infusions on appetite, ghrelin and peptide YY in parenterally fed patients: Clin Nutr. 2006 May 12; [Epub ahead of print
103. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and Peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions Obes Surg. 2006 May;16(5):651-8
104. Boey D, Lin S, Karl T, Baldock P, Lee N, Enriquez R, Couzens M, Slack K, Dallmann R, Sainsbury A, Herzog H. Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity Diabetologia. 2006 Jun;49(6):1360-1370. Epub 2006 Apr 21
105. Robinson K, Vona-Davis L, Riggs D, Jackson B, mcfadden D. Peptide YY attenuates STAT1 and STAT3 activation induced by TNF-alpha in acinar cell line AR42J J Am Coll Surg. 2006 May;202(5):788-96

106. Bromeo T, Sjodin P, Fredriksson R, Boswell T, Larsson TA, Salaneck E, Zoorob R, Mohell N, Larhammar D. Neuropeptide Y-family receptors Y6 and Y7 in chicken. Cloning, pharmacological characterization, tissue distribution and conserved synteny with human chromosome region FEBS J. 2006 May;273(9):2048-63
107. Huda MS, Wilding JP, Pinkney JH. Gut peptides and the regulation of appetite *Obes Rev*. 2006 May;7(2):163-82
108. Boey D, Lin S, Karl T, Baldock P, Lee N, Enriquez R, Couzens M, Slack K, Dallmann R, Sainsbury A, Herzog H. Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity *Diabetologia*. 2006 Apr 21; [Epub ahead of print]
109. Perez-Tilve D, Nogueiras R, Mallo F, Benoit SC, Tschoep M. Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy, balance, and metabolism *Endocrine*. 2006 Feb;29(1):61-71
110. **Wang CJ, Yang NH, Xu MJ, Wu SW, Yang X, Liu L, Sun X.** Relation between peptide YY 3-36 and dietary induced obesity resistant rats [Article in Chinese] *Wei Sheng Yan Jiu*. 2006 Jan;35(1):49-
111. Chan JL, Mun EC, Stoyneva V, Mantzoros CS, Goldfine AB. Peptide YY levels are elevated after gastric bypass surgery *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Feb;14(2):194-
112. Feltrin KL, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR, Meyer JH, Horowitz M, Feinle-isset . Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men *Peptides*. 2006 Jul;27(7):1638-43. Epub 2006 Mar 23
113. Oesch S, Ruegg C, Fischer B, Degen L, Beglinger C. Effect of gastric distension prior to eating on food intake and feelings of satiety in humans *Physiol Behav*. 2006 May 30;87(5):903-10. Epub 2006 Mar 20
114. Morinigo R, Moize V, Musri Glucagon-like peptide-1, peptide YY, hunger, and satiety after gastric bypass surgery in morbidly obese subjects M, Lacy AM, Navarro S, Marin JL, Delgado S, Casamitjana R, Vidal J. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May;91(5):1735-40. Epub 2006 Feb 14
115. Davis J, Hickner RC, Tanenberg RJ, Barakat H. Peptide-YY levels after a fat load in black and white women *Obes Res*. 2005 Dec;13(12):2055-7
116. Nematy M, o'flynn JE, Wandrag L, Brynes AE, Brett SJ, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR, Frost GS. Changes in appetite related gut hormones in intensive care unit patients: a pilot cohort study *crit Care*. 2005 Dec 23;10(1):R10 [Epub ahead of print]
117. **Xu B, Yuan JH, Liu ZC, Chen M, Wang XJ.** Effect of acupuncture on plasma peptide YY in the patient of simple obesity [Article in Chinese] *Zhongguo Zhen Jiu*. 2005 Dec;25(12):837-40
118. Ahituv N, Kavaslar N, Schackwitz W, Ustaszewska A, Collier JM, Hebert S, Doelle H, Dent R, Pennacchio LA, mcpherson R. A PYY Q62P variant linked to human obesity *Hum Mol Genet*. 2006 Feb 1;15(3):387-91. Epub 2005 Dec 20

119. Neary NM, Small CJ, Druce MR, Park AJ, Ellis SM, Semjonous NM, Dakin CL, Filipsson K, Wang F, Kent AS, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5120-7
120. Acuna-Goycolea C, Tamamaki N, Yanagawa Y, Obata K, van den Pol AN. Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus *J Neurosci*. 2005 Aug 10;25(32):7406-19
121. Halatchev IG, Cone RD. Peripheral administration of PYY(3-36) produces conditioned taste aversion in mice *Cell Metab*. 2005 Mar;1(3):159-68
122. Hanusch-Enserer U, Roden M. News in gut-brain communication: a role of peptide YY (PYY) in human obesity and following bariatric surgery? *Eur J Clin Invest*. 2005 Jul;35(7):425-30
123. Torekov SS, Larsen LH, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Holst JJ, Madsen OD, Hansen T, Pedersen O. Evidence of an association between the Arg72 allele of the peptide YY and increased risk of type 2 diabetes *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2261-5
124. Daousi C, macfarlane IA, English PJ, Wilding JP, Patterson M, Dovey TM, Halford JC, Ghatei MA, Pinkney JH. Is there a role for ghrelin and peptide-YY in the pathogenesis of obesity in adults with acquired structural hypothalamic damage? *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Sep;90(9):5025-30
125. Le Roux CW, Bloom SR. Peptide YY, appetite and food intake *Proc Nutr Soc*. 2005 May;64(2):213-6
126. Talsania T, Anini Y, Siu S, Drucker DJ, Brubaker PL. Peripheral exendin-4 and peptide YY(3-36) synergistically reduce food intake through different mechanisms in mice *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3748-56
127. Small CJ, Bloom SR. The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 May;14(5):647-53
128. Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JR, Ghatei MA, Bloom SR. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway *Brain Res*. 2005 May 17;1044(1):127-31
129. Abbott CR, Small CJ, Kennedy AR, Neary NM, Sajedi A, Ghatei MA, Bloom SR. Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake *Brain Res*. 2005 May 10;1043(1-2):139-44
130. Ma L, Tataranni PA, Hanson RL, Infante AM, Kobes S, Bogardus C, Baier LJ. Variations in peptide YY and Y2 receptor genes are associated with severe obesity in Pima Indian men *Diabetes*. 2005 May;54(5):1598-602
131. Shechter Y, Tsubery H, Mironchik M, Rubinstein M, Fridkin M. Reversible pegylation of peptide YY3-36 prolongs its inhibition of food intake in mice *FEBS Lett*. 2005 Apr 25;579(11):2439-44
132. Monteleone P, Martiadis V, Rigamonti AE, Fabrazzo M, Giordani C, Muller EE, Maj M. Investigation of peptide YY and ghrelin responses to a test meal in bulimia nervosa *Biol Psychiatry*. 2005 Apr 15;57(8):926-31
133. King PJ. The hypothalamus and obesity *Curr Drug Targets*. 2005 Mar;6(2):225-40
134. Renshaw D, Batterham RL. Peptide YY: a potential therapy for obesity *Curr Drug Targets*. 2005 Mar;6(2):171-9

135. Koda S, Date Y, Murakami N, Shimbara T, Hanada T, Toshinai K, Nijima A, Furuya M, Inomata N, Osuye K, Nakazato M. *The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats* *Endocrinology*. 2005 May;146(5):2369-75
136. Tovar SA, Seoane LM, Caminos JE, Nogueiras R, Casanueva FF, Dieguez C. *Regulation of peptide YY levels by age, hormonal, and nutritional status* *Obes Res*. 2004 Dec;12(12):1944-50
137. Stock S, Leichner P, Wong AC, Ghatei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, Chanoine JP. *Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents: J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr;90(4):2161-8
138. Dhillon WS, Bloom SR. *Gastrointestinal hormones and regulation of food intake* *Horm Metab Res*. 2004 Nov-Dec;36(11-12):846-51
139. Small CJ, Bloom SR. *Gut hormones as peripheral anti obesity targets* *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004 Oct;3(5):379-88
140. Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. *Intravenous infusion of peptide YY(3-36) potently inhibits food intake in rats* *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):879-88
141. McGowan BM, Bloom SR. *Peptide YY and appetite control* *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Dec;4(6):583-8
142. Korner J, Bessler M, Cirilo LJ, Conwell IM, Daud A, Restuccia NL, Wardlaw SL. *Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin: J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):359-65
143. Moran TH, Smedh U, Kinzig KP, Scott KA, Knipp S, Ladenheim EE. *Peptide YY(3-36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Feb;288(2):R384-8
144. Small CJ, Bloom SR. *Gut hormones and the control of appetite* *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Aug;15(6):259-63
145. Hung CC, Pirie F, Luan J, Lank E, Motala A, Yeo GS, Keogh JM, Wareham NJ, O'Rahilly S, Farooqi IS. *Studies of the peptide YY and neuropeptide Y2 receptor genes in relation to human obesity and obesity-related traits* *Diabetes*. 2004 Sep;53(9):2461-6
146. Adams SH, Won WB, Schonhoff SE, Leiter AB, Paterniti JR Jr. *Effects of peptide YY[3-36] on short-term food intake in mice are not affected by prevailing plasma ghrelin levels* *Endocrinology*. 2004 Nov;145(11):4967-75
147. Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA. *Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression* *Neuroendocrinology*. 2004;79(6):317-26
148. Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. *Comparison of the inhibitory effects of PYY(3-36) and PYY(1-36) on gastric emptying in rats* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Nov;287(5):R1064-70
149. Pittner RA, Moore CX, Bhavsar SP, Gedulin BR, Smith PA, Jodka CM, Parkes DG, Paterniti JR, Srivastava VP, Young AA. *Effects of PYY[3-36] in rodent models of diabetes and obesity* *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Aug;28(8):963-71
150. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. *Brain-gut axis and its role in the control of food intake* *J Physiol Pharmacol*. 2004 Mar;55(1 Pt 2):137-54

151. Stanley S, Wynne K, Bloom S. *Gastrointestinal satiety signals III. Glucagon-like peptide 1, oxyntomodulin, peptide YY, and pancreatic polypeptide: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 May;286(5):G693-7
152. Halatchev IG, Ellacott KL, Fan W, Cone RD. *Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2585-90
153. Lin HC, Neevel C, Chen JH. *Slowing intestinal transit by PYY depends on serotonergic and opioid pathways Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Apr;286(4):G558-63
154. Challis BG, Pinnock SB, Coll AP, Carter RN, Dickson SL, O'Rahilly S. *Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Nov 28;311(4):915-9
155. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. *Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36 N Engl J Med.* 2003 Sep 4;349(10):941-8
156. Batterham RL, Bloom SR. *The gut hormone peptide YY regulates appetite Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;994:162-8
157. Neary NM, Small CJ, Bloom SR. *Gut and mind Gut.* 2003 Jul;52(7):918-21
158. Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. *Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):948-53. Epub 2003 May 15
159. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. *Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake Nature.* 2002 Aug 8;418(6898):650-4
160. Alvarez Bartolome M, Borque M, Martinez-Sarmiento J, Aparicio E, Hernandez C, Cabrerizo L, Fernandez-Represa JA. *Peptide YY secretion in morbidly obese patients before and after vertical banded gastroplasty Obes Surg.* 2002 Jun;12(3):324-7
161. Imamura M. *Effects of surgical manipulation of the intestine on peptide YY and its physiology Peptides.* 2002 Feb;23(2):403-7
162. El-Salhy M, Suhr O, Danielsson A. *Peptide YY in gastrointestinal disorders Peptides.* 2002 Feb;23(2):397-402
163. Tseng WW, Liu CD. *Peptide YY and cancer: current findings and potential clinical applications Peptides.* 2002 Feb;23(2):389-95 Mannon PJ. *Peptide YY as a growth factor for intestinal epithelium Peptides.* 2002 Feb;23(2):383-8
164. Aponte GW. *PYY-mediated fatty acid induced intestinal differentiation Peptides.* 2002 Feb;23(2):367-76
165. Yang H. *Central and peripheral regulation of gastric acid secretion by peptide YY Peptides.* 2002 Feb;23(2):349-58
166. Keire DA, Bowers CW, Solomon TE, Reeve JR Jr. *Structure and receptor binding of PYY analogs Peptides.* 2002 Feb;23(2):305-21
167. Onaga T, Zabielski R, Kato S. *Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract Peptides.* 2002 Feb;23(2):279-90

168. *Conlon JM. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP) Peptides. 2002 Feb;23(2):269-78*
169. *Lin HC, Chey WY, Zhao X. Release of distal gut peptide YY (PYY) by fat in proximal gut depends on CCK Peptides. 2000 Oct;21(10):1561-3*

Citas Bibliográficas:

- ¹ National Institutes of Health. Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report. *Obes Res* 1998;6(Suppl 2):51S–209S.
- ² Kohn M, Booth M. THE worldwide epidemic of obesity in adolescents. *Adolescent Medicine Volume 14 • Number 1 • February 2003*
- ³ World Health Organization. Turning the tide of malnutrition: responding to the challenge of the 21st century. Available at: www.who.int/nut/documents/nhd_brochure.pdf. Accessed December 3, 2004.
- ⁴ Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes and obesity-related health risk factors. *JAMA* 2003;289:76– 9.
- ⁵ Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, et al. Prevalence and trends in obesity among US adults 1999–2000. *JAMA* 2002;288:1723– 7.
- ⁶ Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, et al. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990–2000. *JAMA* 2002;288:1758 –61.
- ⁷ National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Obesity trends among US adults between 1985 and 2003. Available at: www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/obesity/. Accessed December 2, 2004.
- ⁸ Williamson DF. Descriptive epidemiology of body weight and weight change in US adults. *Ann Intern Med* 1993;119:646–9.
- ⁹ Slyper, A. The Pediatric Obesity Epidemic: Causes and Controversies *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Volume 89 • Number 6 • June 2004
- ¹⁰ Strauss RS, Pollack HA. Epidemic increase in childhood overweight, 1986–1998. *JAMA* 2001;286(22):2845–8.
- ¹¹ Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, et al. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999–2000. *JAMA* 2002;288(14):1728–32.
- ¹² Krosnick A. The diabetes and obesity epidemic among the Pima Indians. *N J Med*. 2000 Aug;97(8):31-7.
- ¹³ Price RA, Charles MA, Pettitt DJ, Knowler WC. Obesity in Pima Indians: genetic segregation analyses of body mass index complicated by temporal increases in obesity. *Hum Biol*. 1994 Apr;66(2):251-74.
- ¹⁴ Damcott C, Sack P, Shuldiner A, The genetics of obesity. *Endocrinol Metab Clin N Am* 32 (2003) 761–786
- ¹⁵ A. Kazaks, J.S. Stern Obesity: food intake *Prim Care Clin Office Pract* 30 (2003) 301–316
- ¹⁶ Bensimhon D, Kraus W, Donahue M Obesity and physical activity: A review *American Heart Journal* Volume 151, Number 3 (*Am Heart J* 2006;151:598-603.)
- ¹⁷ T.A. Wadden, M.L. Butryn Behavioral treatment of obesity *Endocrinol Metab Clin N Am* 32 (2003) 981–1003
- ¹⁸ Pender J, Pories W. Epidemiology of Obesity in the United States *Gastroenterol Clin N Am*, 34 (2005) 1–7
- ¹⁹ Gillum RF. The association of body fat distribution with hypertension, hypertensive heart disease, coronary heart disease, diabetes and cardiovascular risk factors in men and women aged 18–79 years. *J Chronic Dis* 1987;40:421–8
- ²⁰ Garfinkel L. Overweight and cancer. *Ann Intern Med* 1985;103:1034–6.

-
- ²¹ VanItallie TB. Obesity: adverse effects on health and longevity. *Am J Clin Nutr* 1979;32: 2723–33.
- ²² Funnell IC, Bornman PC, Weakley SP, et al. Obesity: an important prognostic factor in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1993;80:484–6.
- ²³ Nauta RJ. A radical approach to bacterial panniculitis of the abdominal wall in the morbidly obese. *Surgery* 1990;107:134–9.
- ²⁴ Schauer PR, Ramos R, Ghiatas AA, et al. Virulent diverticular disease in young obese men. *Am J Surg* 1992;164:443–8.
- ²⁵ Deitel M, To TB, Stone E, Sutherland D, et al. Sex hormonal changes accompanying loss of massive excess weight. *Gastroenterol Clin North Am* 1987;16:511–5.
- ²⁶ Bump RC, Sugerman HJ, Fantl JA, et al. Obesity and lower urinary tract function in women: effect of surgically induced weight loss. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:392–9.
- ²⁷ Sugerman HJ, Felton WL, Salvant JB, et al. Effects of surgically induced weight loss on idiopathic intracranial hypertension on morbid obesity. *Neurology* 1995;45:1655–9.
- ²⁸ Sarlio-Lahteenkorva S, Stunkard A, Rissanen A. Psychosocial factors and quality of life in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19(Suppl 6):S1–5.
- ²⁹ Stunkard AJ, Wadden TA. Psychological aspects of severe obesity. *Am J Clin Nutr* 1992;55: 524S–32S.
- ³⁰ DeWald T, Khaodhjar L, Donahue M, Blackburn G. Pharmacological and surgical treatments for obesity, *American Heart Journal*, Volume 151, Number 3 March 2006
- ³¹ Bays H. Current and Investigational Antiobesity Agents and Obesity Therapeutic Treatment Targets *OBSESITY RESEARCH* Vol. 12 No. 8 August 2004
- ³³ Michael K. Badman and Jeffrey S. Flier The Gut and Energy Balance: Visceral Allies in the Obesity Wars *SCIENCE* VOL 307 25 MARCH 2005
- ³⁴ Kellow JE, Azpiroz F, Delvaux M, Gebhart GF, Mertz HR, Quigley EM, Smout AJ. Applied principles of neurogastroenterology: physiology/motility sensation. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1412-20
- ³⁵ Sobocki J, Krolczyk G, Herman RM, Matyja A, Thor PJ. Influence of vagal nerve stimulation on food intake and body weight - results of experimental studies. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56 Suppl 6:27-33
- ³⁶ Banks wadenial versus dualism: the blood-brain barrier as an interface of the gut-brain axis *Endocrinology*. 2006 Jun;147(6):2611-5.
- ³⁷ Filaretova L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection *Auton Neurosci*. 2006 Apr 30;125(1-2):86-93. Epub 2006 Feb 14
- ³⁸ Travagli RA, Rogers RC. Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. V. Fast and slow extrinsic modulation of dorsal vagal complex circuits *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Sep;281(3):G595-601
- ³⁹ Kershaw , Flier. Adipose Tissue as an Endocrine Organ *J Clin Endocrinol Metab*, June 2004, 89(6):2548–2556
- ⁴⁰ Conlon JM. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP) Peptides. 2002 Feb;23(2):269-78

-
- ⁴¹ Keire DA, Bowers CW, Solomon TE, Reeve JR Jr. Structure and receptor binding of PYY analogs Peptides. 2002 Feb;23(2):305-21
- ⁴² Onaga T, Zabielski R, Kato S. Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract Peptides. 2002 Feb;23(2):279-90
- ⁴³ Yang H. Central and peripheral regulation of gastric acid secretion by peptide YY Peptides. 2002 Feb;23(2):349-58
- ⁴⁴ Halatchev IG, Ellacott KL, Fan W, Cone RD. Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism Endocrinology. 2004 Jun;145(6):2585-90
- ⁴⁵ Batterham RL, Bloom SR. The gut hormone peptide YY regulates appetite Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;994:162-8
- ⁴⁶ Neary NM, Small CJ, Bloom SR. Gut and mind Gut. 2003 Jul;52(7):918-21
- ⁴⁷ Lin HC, Neevel C, Chen JH. Slowing intestinal transit by PYY depends on serotonergic and opioid pathways Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Apr;286(4):G558-63
- ⁴⁸ Acuna-Goycolea C, Tamamaki N, Yanagawa Y, Obata K, van den Pol AN. Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus J Neurosci. 2005 Aug 10;25(32):7406-19
- ⁴⁹ Collie NL, Walsh JH, Wong HC, Shively JE, Davis MT, Lee TD, Reeve JR Jr. Purification and sequence of rat oxyntomodulin Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Sep 27;91(20):9362-6
- ⁵⁰ Carles-Bonnet C, Martinez J, Jarrousse C, Aumelas A, Niel H, Bataille D. H-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-OH is the minimal active structure of oxyntomodulin Peptides. 1996;17(3):557-61
- ⁵¹ Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, Sinha Roy R. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38) J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25):22418-23. Epub 2003 Apr 10
- ⁵² Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans J Clin Endocrinol Metab. 2003 Oct;88(10):4696-701
- ⁵³ Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Minireview: Gut peptides regulating satiety Endocrinology. 2004 Jun;145(6):2660-5. Epub 2004 Mar 24
- ⁵⁴ Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei A, Bloom SR. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats Endocrinology. 2004 Jun;145(6):2687-95. Epub 2004 Mar 4
- ⁵⁵ Wynne K, Park AJ, Small CJ, Meeran K, Ghatei MA, Frost GS, Bloom SR. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial Int J Obes (Lond). 2006 Apr 18
- ⁵⁶ Small CJ, Bloom SR The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity Expert Opin Investig Drugs. 2005 May;14(5):647-53

-
- ⁵⁷ Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei A, Bloom SR. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2687-95. Epub 2004 Mar 4
- ⁵⁸ Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Oct;88(10):4696-701
- ⁵⁹ Neary NM, Small CJ, Druce MR, Park AJ, Ellis SM, Semjonous NM, Dakin CL, Filipsson K, Wang F, Kent AS, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5120-7
- ⁶⁰ Small CJ, Bloom SR. The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 May;14(5):647-53
- ⁶¹ Renshaw D, Batterham RL. Peptide YY: a potential therapy for obesity *Curr Drug Targets*. 2005 Mar;6(2):171-9
- ⁶² Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36 *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):941-8
- ⁶³ Lemoine NR, *Understanding Gene Therapy*, Bios Scientific Publishers Limited, UK, 1999
- ⁶⁴ *Gene Therapy; The use of DNA as a Drug*, Gavin Books Pharmaceutical Press, USA, 2002
- ⁶⁵ Mathews et al. *Gene Therapy Methods*, Chapter 23, Academic Press, 2002, USA
- ⁶⁶ Kalra SP, Kalra PS Subjugation of hypothalamic NPY and cohorts with central leptin gene therapy alleviates dyslipidemia, insulin resistance, and obesity for life-time, *EXS*. 2006;(95):157-69
- ⁶⁷ Zhang Y, Scarpace PJ. Circumventing central leptin resistance: lessons from central leptin and POMC gene delivery. *Peptides*. 2006 Feb;27(2):350-64. Epub 2005 Nov 4. Review
- ⁶⁸ Li G, Zhang Y, Wilsey JT, Scarpace PJ. Hypothalamic pro-opiomelanocortin gene delivery ameliorates obesity and glucose intolerance in aged rats. *Diabetologia*. 2005 Nov;48(11):2376-85. Epub 2005 Oct 5.
- ⁶⁹ Shklyaev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpace PJ, Zolotukhin S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14217-22. Epub 2003 Nov 14.
- ⁷⁰ Park JH, Lee M, Kim SW. Non-viral adiponectin gene therapy into obese type 2 diabetic mice ameliorates insulin resistance. *J Control Release*. 2006 Jun 20
- ⁷¹ Wynne K, Park AJ, Small CJ, Meeran K, Ghatei MA, Frost GS, Bloom SR. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial *Int J Obes (Lond)*. 2006 Apr 18
- ⁷² Small CJ, Bloom SR The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 May;14(5):647-53
- ⁷³ Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei A, Bloom SR. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2687-95. Epub 2004 Mar 4

-
- ⁷⁴ Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Oct;88(10):4696-701
- ⁷⁵ Neary NM, Small CJ, Druce MR, Park AJ, Ellis SM, Semjonous NM, Dakin CL, Filipsson K, Wang F, Kent AS, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5120-7
- ⁷⁶ Small CJ, Bloom SR. The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 May;14(5):647-53
- ⁷⁷ Renshaw D, Batterham RL. Peptide YY: a potential therapy for obesity *Curr Drug Targets*. 2005 Mar;6(2):171-9
- ⁷⁸ Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36 *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):941-8
- ⁷⁹ Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part II. Changes after gastrointestinal surgery and bariatric surgery. (Part I. Distribution, release and actions -- appeared in the last issue (May 2006)) *Obes Surg*. 2006 Jun;16(6):795-803
- ⁸⁰ Stratis C, Alexandrides T, Vagenas K, Kalfarentzos F. Ghrelin and peptide YY levels after a variant of biliopancreatic diversion with Roux-en-Y gastric bypass versus after colectomy: a prospective comparative study *Obes Surg*. 2006 Jun;16(6):752-8
- ⁸¹ Chan JL, Mun EC, Stoyneva V, Mantzoros CS, Goldfine AB. Peptide YY levels are elevated after gastric bypass surgery *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Feb;14(2):194-8
- ⁸² Zolotukhin S. Gene therapy for obesity. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Mar;5(3):347-57. Review.