

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Cardio Nefro Toraciche**

Ciclo 34

**Settore Concorsuale:** 05/E2 -BIOLOGIA MOLECOLARE

**Settore Scientifico Disciplinare:** BIO/11 - BIOLOGIA MOLECOLARE

**STUDIO DEGLI EFFETTI DI CITOCINE A BASSO DOSAGGIO (*LOW DOSE*) SU CELLULE DI ORIGINE ANIMALE (3T3-L1) ED UMANA (hASC)**

**Presentata da:** Valentina Taglioli

**Coordinatore Dottorato**

Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

**Supervisore**

Prof.ssa Elena Bonora

**Co-supervisore**

Alessandro Perra

**Esame finale anno 2022**

# ABSTRACT

Nella sindrome metabolica l'insulino-resistenza e l'obesità rappresentano i fattori chiave nello sviluppo di tale patologia, ma il principale *player* risulta un'inflammation cronica di basso grado (*Chronic Low Grade Inflammation*) a carico del tessuto adiposo.

Lo scopo di questo progetto di ricerca è quindi stato quello di testare citochine a basso dosaggio come possibile trattamento dell'inflammation cronica. Le citochine utilizzate (GUNA®-Interleukin 4 (IL-4), GUNA®-Interleukin 10 (IL-10), GUNA®-Melatonin, GUNA®-Melatonin+GUNA®-IL-4.) sono state fornite dall'azienda GUNA S.p.a.

Poiché l'inflammation cronica a basso grado inizia in seguito ad un aumento eccessivo del tessuto adiposo, inizialmente si è valutato l'effetto su una linea di preadipociti murini (3T3-L1). Questa prima parte dello studio ha messo in evidenza come le citochine a basso dosaggio non modificano la vitalità cellulare, anche se agiscono sull'espressione e la localizzazione di vimentina e E-caderina. Inoltre IL-4 e IL-10 sembrano avere una parziale attività inibitoria, non significativa, sull'adipogenesi ad eccezione dell'espressione dell'adiponectina che appare significativamente aumentata. In ultimo i trattamenti con IL-4 e IL-10 hanno mostrato una diminuzione del contenuto di ROS e una ridotta attività antiinflammatoria dovuta alla diminuzione di IL-6 secreto.

Un'altra popolazione cellulare principale nel tessuto adiposo è rappresentata dalle ASC (*Adipose Stem Cell*). Per tale motivo si è proseguito valutando l'effetto che le citochine low-dose su questo citotipo, evidenziando che il trattamento con le citochine non risulta essere tossico, anche se sembrerebbe rallentare la crescita cellulare, e determina un'inibizione del processo adipogenico. Inoltre il trattamento con IL-10 sembra stimolare le ASC a produrre fattori che inducono una maggiore vasculogenesi e le induce a produrre fattori chemiotattici che determinano una maggiore capacità di rigenerazione tissutale da parte di MSC da derma. Infine, il trattamento con IL-4 e IL-10 stimola probabilmente una minore produzione di citochine pro-inflammatorie che inducono in maniera significativa una minore mobilità di cellule MSC.

# Indice

1. INTRODUZIONE .....	5
1.1 Malattie cardiovascolari.....	5
1.2 Sindrome metabolica .....	6
1.2.1 Patofisiologia.....	7
1.3 Infiammazione e sindrome metabolica .....	9
1.3.1 Tessuto adiposo e infiammazione .....	11
1.3.2 Cellule staminali adipose.....	15
1.4 Strategie terapeutiche per la sindrome metabolica .....	18
1.4.1 Terapia anti-infiammatoria.....	21
1.4.2 Un nuovo approccio terapeutico: <i>Low Dose Medicine</i> .....	22
2. SCOPO .....	25
3. MATERIALI E METODI .....	26
3.1 Citochine.....	26
3.2 Modelli cellulari.....	26
3.2.1 Linea di pre-adipociti murini (3T3-L1) .....	26
3.2.2 Cellule staminali adipose (ASC) .....	26
3.2.3 Altri tipi cellulari .....	27
3.3 Valutazione della crescita cellulare .....	27
3.4 Valutazione del fenotipo cellulare in immunofluorescenza .....	28
3.5 Differenziamento adipogenico.....	28
3.5.1 3T3-L1 .....	28
3.5.2 ASC .....	29
3.6 Valutazione dell'adipogenesi e della lipolisi.....	29
3.7 Western Blot .....	30
3.8 Saggio ELISA .....	31
3.9 Valutazione dello stress ossidativo in <i>live imaging</i> .....	32
3.10 Saggio funzionale di vasculogenesi .....	32
3.11 Saggio funzionale di <i>Wound Healing</i> .....	32
3.12 Saggio di migrazione cellulare.....	33
3.13 Analisi statistica.....	33
4. RISULTATI .....	34
4.1 Effetto delle citochine low-dose sulla vitalità e sul fenotipo cellulare delle 3T3-L1 ....	34
4.2 Effetto delle citochine low-dose sul differenziamento adipogenico delle 3T3-L1.....	36

4.2.1	Colorazione con Oil Red O .....	36
4.2.2	Quantificazione dell'adipogenesi e della lipolisi .....	37
4.2.3	Western Blot .....	38
4.3	Effetto anti-infiammatorio delle citochine <i>low-dose</i> sulle 3T3-L1 .....	40
4.4	Analisi degli effetti protettivi delle citochine <i>low-dose</i> sulle 3T3-L1 sottoposte a stress ossidativo .....	40
4.5	Isolamento di cellule staminali adipose.....	41
4.6	Studio degli effetti delle citochine <i>low dose</i> sulla vitalità cellulare delle ASC .....	43
4.7	Effetto delle citochine <i>low dose</i> sul differenziamento adipogenico delle ASC .....	43
4.7.1	Colorazione con Oil Red O .....	43
4.7.2	Western Blot .....	44
4.8	Effetti del trattamento con citochine <i>low dose</i> su angiogenesi, migrazione e rigenerazione cellulare .....	47
4.8.1	Saggio di vasculogenesi.....	47
4.8.2	Saggio di <i>wound healing</i> .....	48
4.8.3	Saggio di migrazione cellulare.....	49
5.	DISCUSSIONE.....	51
6.	BIBLIOGRAFIA .....	57

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari (CVD, *cardiovascular disease*) rappresentano la prima causa di morte nella popolazione femminile e maschile in Europa. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), si stima che le malattie cardiovascolari causino 4,35 milioni di decessi ogni anno nei 52 stati che compongono la Regione Europea, e più di 1,9 milioni di decessi nell'Unione Europea. Secondo i dati ISTAT, in Italia la spesa per gli interventi cardiocirurgici è stimabile in circa 650 milioni di euro l'anno e rappresenta l'1% della spesa sanitaria complessiva. Inoltre, i farmaci per le patologie cardiovascolari sono i più utilizzati, per un importo di 5 miliardi di euro, con una copertura del Sistema Sanitario Nazionale (SSN) di quasi il 93% (*Ministero della Salute*).

Le malattie cardiovascolari sono un gruppo di patologie principalmente correlate all'aterosclerosi, a carico del cuore e dei vasi sanguigni. Esse rappresentano un processo patologico che colpisce il sistema arterioso nella sua interezza determinando il restringimento progressivo delle arterie fino alla loro completa ostruzione. Per tale motivo, a seconda di quale distretto arterioso viene colpito, si hanno manifestazioni cliniche differenti che possono portare a:

- cardiopatia coronarica, causata dall'occlusione delle arterie coronariche
- malattia cerebrovascolare, causata dall'occlusione dei vasi responsabili dell'irrorazione del cervello
- arteriopatia periferica, caratterizzata dall'ostruzione o dal restringimento delle arterie degli arti superiori e inferiori
- malattia reumatica cardiaca, con danno al muscolo e alle valvole cardiache in seguito ad una febbre reumatica causata da uno streptococco
- malattia cardiaca congenita, dovuta a una malformazione del cuore presente dalla nascita
- trombosi ed embolia polmonare.

Le malattie cardiovascolari mostrano un'eziogenesi complessa e multifattoriale, motivo per il quale possiamo distinguere fattori di rischio non modificabili (età, storia familiare, sesso) e modificabili (stile di vita, dieta, esercizio fisico, abuso di alcol e fumo). Più nello specifico ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, diabete, insulino-resistenza e obesità rappresentano i principali fattori di rischio strettamente correlati all'aumentato rischio di sviluppare malattie

cardiovascolari. Ciò che è interessante notare è che tale *cluster* fattoriale descrive quella che ad oggi è definita come “sindrome metabolica”.

Questa premessa suggerisce quindi che vi sia una stretta correlazione tra le malattie cardiovascolari e la sindrome metabolica, tanto che un individuo affetto da tale patologia presenta un rischio aumentato del 60% di sviluppare malattie cardiovascolari (Qiao et al., 2007).

## 1.2 Sindrome metabolica

La prevalenza nel mondo della sindrome metabolica varia dal 10% fino all'84% in base alla regione, ambiente urbano o rurale, popolazione studiata (sesso, età ed etnia) e definizione di sindrome utilizzata. In generale si può stimare che un quarto della popolazione mondiale adulta sia affetto da sindrome metabolica (International Diabetes Federation). Essa può essere descritta come l'associazione di condizioni cliniche specifiche quali obesità, iperglicemia, ipertensione arteriosa, dislipidemia e iperuricemia.

L'identificazione della sindrome metabolica come una patologia a sé risale al 1920 quando Eskil Kylin, un medico internista svedese, dimostrò l'associazione tra la pressione sanguigna alta (ipertensione), l'iperglicemia e una forma di artrite infiammatoria. Più tardi, nel 1947, il medico francese Jean Vague descrisse come l'obesità viscerale fosse associata comunemente a pazienti con malattie cardiovascolari o con diabete di tipo 2. Nel 1965, ad un congresso annuale dell'Associazione Europea per lo studio del Diabete, fu presentato un *Abstract* che definiva “sindrome” la correlazione tra ipertensione, iperglicemia e obesità (Kaur et al., 2014). Fu l'endocrinologo americano Gerald Reaven che nel 1988 descrisse la “sindrome X” come una patologia determinata da un *cluster* di fattori di rischio per le malattie cardiovascolari e il diabete, che comprendeva insulino-resistenza, iperglicemia, alta concentrazione di colesterolo LDL (*Low Density Lipoprotein*), bassa concentrazione di colesterolo HDL (*High Density Lipoprotein*) e ipertensione. Il passaggio da sindrome a malattia richiede il riconoscimento di un fattore eziopatogenetico comune alle diverse componenti della sindrome e fu sempre Reaven uno dei primi autori a ipotizzare che l'insulino-resistenza fosse il “*primum movens*” per i disturbi metabolici (Zuliani et al., 2012). In questa prima definizione egli non inserì tra i fattori diagnostici l'obesità, che fu aggiunta solo più tardi come una delle alterazioni cruciali (Qiao et al., 2007), più precisamente nel 1998 quando l'OMS pubblicò la prima definizione e i criteri diagnostici della sindrome metabolica, ponendo come condizione necessaria la presenza di insulino-resistenza a cui dovevano essere associati almeno due criteri tra i quali dislipidemia, obesità centrale, ipertensione arteriosa e microalbuminuria (Zuliani et al., 2012).

Con il passare degli anni si sono susseguite modifiche nella definizione di sindrome metabolica, fino agli ultimi criteri diagnostici del 2009 in cui vengono definite le linee guida che identificano tale patologia, condivise dalla *World Health Organization* (WHO), dall'*European Group for the study of Insulin Resistance* (EGIR), dal *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III), dall'*American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) e dall'*International Diabetes Federation* (IDF) (Figura 1).

È dunque evidente come ci sia una continua ricerca dell'agente eziopatologico della sindrome; infatti, nel 2005 si individuò come fattore fondamentale della sindrome metabolica l'obesità centrale, più tardi relazionata ad un nuovo fattore di rischio cardiovascolare, i.e. l'infiammazione cronica di basso grado (Frohlich et al., 2000).

Clinical measures	WHO (1998) [5]	EGIR (1999) [6]	ATPIII (2001) [7]	AACE (2003) [8]	IDF (2005) [9]
Insulin resistance	IGT, IFG, T2DM, or lowered insulin Sensitivity <sup>a</sup> plus any 2 of the following	Plasma insulin >75th percentile plus any 2 of the following	None, but any 3 of the following 5 features	IGT or IFG plus any of the following based on the clinical judgment	None
Body weight	Men: waist-to-hip ratio >0.90; women: waist-to-hip ratio >0.85 and/or BMI > 30 kg/m <sup>2</sup>	WC ≥94 cm in men or ≥80 cm in women	WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women	BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>	Increased WC (population specific) plus any 2 of the following
Lipids	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <35 mg/dL in men or <39 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <39 mg/dL in men or women	TGs ≥150 mg/dL HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL or on TGs Rx. HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or on HDL-C Rx
Blood pressure	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg or on hypertension Rx	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg systolic or ≥85 mm Hg diastolic or on hypertension Rx
Glucose	IGT, IFG, or T2DM	IGT or IFG (but not diabetes)	>110 mg/dL (includes diabetes)	IGT or IFG (but not diabetes)	≥100 mg/dL (includes diabetes) <sup>b</sup>
Other	Microalbuminuria: Urinary excretion rate of >20 mg/min or albumin: creatinine ratio of >30 mg/g.			Other features of insulin resistance <sup>c</sup>	

Figura 1: Criteri diagnostici proposti per la diagnosi della Sindrome Metabolica (Kaur et al., 2014)

## 1.2.1 Patofisiologia

L'obesità rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di iperglicemia, ipertensione, dislipidemia e insulino-resistenza (Qiao et al., 2007). Tale condizione può essere descritta da un accumulo di grasso corporeo, caratterizzato da un aumento del tessuto adiposo, principalmente determinato dall'elevato consumo di cibi ipercalorici e dalla ridotta attività fisica (Castro et al., 2016).

Il tessuto adiposo è un insieme eterogeneo di adipociti, pre-adipociti stromali, cellule immunitarie ed endoteliali ed è in grado di rispondere rapidamente all'assunzione in eccesso di nutrienti tramite l'iperplasia e l'ipertrofia degli adipociti. In condizioni di obesità e di progressivo aumento degli adipociti, l'apporto sanguigno al tessuto si riduce portando ad una condizione di ipossia. L'ipossia è poi responsabile della necrosi, e di conseguenza,

dell'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo, che comandano un'iper-produzione di metaboliti biologicamente attivi, detti adipocitochine, che includono glicerolo, acidi grassi liberi (FFA, *Free Fatty Acid*) e mediatori pro-infiammatori. Ciò comporta un processo infiammatorio inizialmente localizzato al tessuto adiposo, ma che si propaga in un processo flogistico sistemico associato allo sviluppo delle comorbilità dell'obesità (Kaur et al., 2014).

L'aumento del *turnover* degli acidi grassi liberi e l'aumento degli FFA circolanti sono strettamente associati all'insulino-resistenza, che rappresenta un fenomeno secondario all'eccesso di grasso viscerale. L'insulino-resistenza è una condizione patofisiologica in cui concentrazioni normali di insulina non sono in grado di indurre una corretta risposta nei tessuti periferici. In queste condizioni le cellule beta pancreatiche secernono una maggiore quantità di insulina (iperinsulinemia) per tentare di compensare tale condizione, ma, se all'inizio questa compensazione riesce a mantenere i valori di glicemia normali, in uno stadio avanzato le cellule pancreatiche non riescono più a produrre sufficiente ormone portando quindi a iperglicemia e successivamente a diabete di tipo 2 (Peterson and Shulman, 2006). L'aumento degli FFA circolanti induce insulino-resistenza inibendo l'*uptake* del glucosio a livello cellulare e il suo utilizzo.

L'alterazione lipidica in pazienti affetti da sindrome metabolica determina la triade della dislipidemia aterogena costituita da ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL e un aumento delle dimensioni delle particelle di colesterolo LDL. L'insulino-resistenza guida lo sviluppo di questa dislipidemia in diversi modi. Normalmente l'insulina inibisce la lipolisi negli adipociti, ma in condizioni di insulino-resistenza il suo segnale è compromesso e quindi si ha un aumento dell'attività lipolitica con una maggiore produzione di FFA. Nel fegato gli FFA rappresentano il substrato per la produzione dei trigliceridi, che aumentano di conseguenza. Gli FFA inoltre stabilizzano la produzione di apolipoproteina B (ApoB), la principale lipoproteina che costituisce le particelle VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) portando ad un'iper-produzione di VLDL. L'insulina, in condizioni fisiologiche, degrada la proteina ApoB tramite la *pathway* della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), ma l'insulino-resistenza aumenta direttamente la produzione di VLDL. Infine, l'insulina regola anche l'attività della lipoprotein lipasi, enzima responsabile della corretta *clearance* delle VLDL. Per cui l'ipertrigliceridemia nell'insulino-resistenza è determinata sia da un'aumentata produzione di VLDL sia da una ridotta *clearance* di queste ultime. Le VLDL sono metabolizzate a lipoproteine e LDL, entrambi promotori della formazione dell'ateroma (detto anche placca) (Lewis and Steiner, 1996).

All'insulino-resistenza è inoltre associata una condizione di ipertensione tramite l'attivazione del sistema renina-angiotensina con l'aumento di espressione dell'angiotensinogeno, dell'angiotensina II e del recettore AT1. Recenti evidenze dimostrano che l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia attivano il sistema nervoso simpatico determinando un aumento dell'assorbimento di sodio a livello renale, mentre il cuore aumenta la gittata cardiaca e le arterie rispondono con la vasocostrizione che comporta l'ipertensione (Morse et al., 2005).

Obesità ed insulino-resistenza sembrano quindi essere i principali fattori responsabili della sindrome metabolica, anche se ad oggi è chiaro che il principale *player* di tale patologia e delle conseguenze che essa comporta è un processo infiammatorio cronico definito *Chronic Low Grade Inflammation* (Monteiro and Azavedo, 2010).

### 1.3 Infiammazione e sindrome metabolica

Negli ultimi decenni la ricerca di un meccanismo di patogenesi che correli obesità, insulino-resistenza e diabete ha dimostrato una stretta relazione tra l'eccesso di nutrienti e l'attivazione del sistema immunitario innato nella maggior parte degli organi pertinenti al mantenimento dell'omeostasi energetica. Numerosi studi, inoltre, hanno evidenziato che l'infiammazione si manifesta in seguito all'obesità ed è essa stessa ad avere un ruolo chiave nello sviluppo dell'insulino-resistenza.

Lo stato infiammatorio che caratterizza la sindrome metabolica necessita di una particolare presentazione in quanto non è identificata né da infezione né da un danno massivo ai tessuti, bensì da un'attivazione del processo infiammatorio costante e di dimensioni ridotte, definita come infiammazione cronica di "basso grado". A conferma di ciò, studi recenti hanno dimostrato l'associazione tra gli indici di obesità e i marker infiammatori, tra i quali la proteina C-reattiva CRP (Monteiro and Azevedo, 2010).

Per tale motivo, la natura di questo processo infiammatorio differisce dagli altri paradigmi infiammatori in quanto è l'attivazione del sistema immunitario innato che determina un effetto sull'omeostasi metabolica e che coinvolge più organi quali tessuto adiposo, pancreas, fegato, muscolo scheletrico, cuore e cervello (Figura 2) (Saltiel and Olefski, 2017).

Quale sia l'innescò vero e proprio dell'infiammazione associata ad una condizione di obesità è tutt'oggi non chiaro e può variare a seconda del tessuto che si prende in esame. Molti dei meccanismi sono stati investigati a partire da un modello animale di topo obeso: per esempio, l'obesità determina un aumento della permeabilità intestinale, che comporta un incremento dei livelli circolanti di lipopolisaccaride (LPS), componente della membrana esterna dei batteri Gram-negativi intestinali. Questo potrebbe essere uno degli eventi scatenanti la cascata

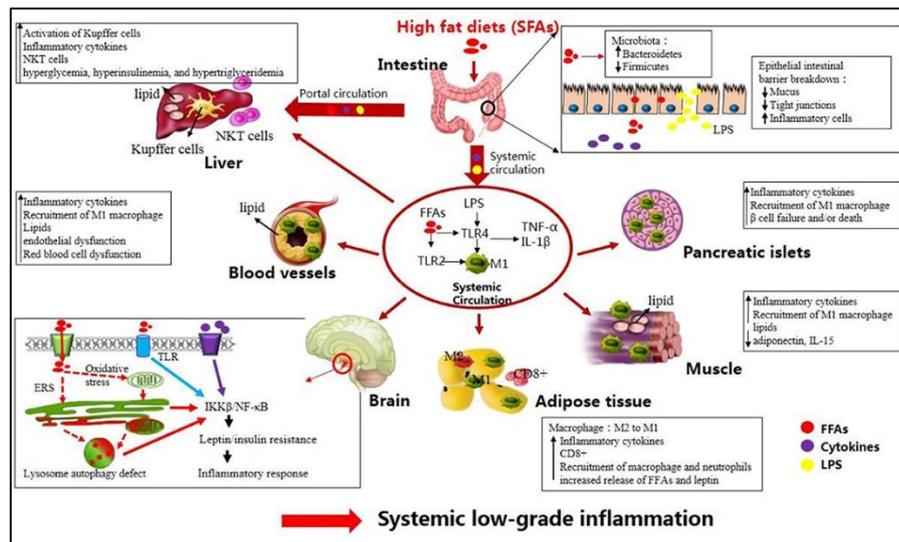
infiammatoria, tramite l'attivazione dei recettori TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) nelle cellule del grasso. Un evento simile si potrebbe verificare anche nel fegato. A supporto di questa teoria, elevati livelli di LPS sono stati ritrovati in pazienti affetti da diabete di tipo 2 (Mathis, 2013).

Un altro possibile promotore del processo infiammatorio potrebbe essere la presenza elevata di specie lipidiche nei pazienti obesi dovuta ad una dieta ipercalorica. Gli acidi grassi liberi inducono l'infiammazione indirettamente legando TLR4 e TLR2 tramite la proteina fetuina A, che attiva le *pathway* di JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e NF-Kb (*Nuclear transcription Factor Kappa b*). Una volta attivate, queste *pathway* aumentano la sintesi e la secrezione di chemochine (tra le quali MCP-1) da parte degli adipociti o degli epatociti, promuovendo l'infiltrazione di macrofagi pro-infiammatori.

Vi sono inoltre evidenze per cui l'ipossia, che si sviluppa nel tessuto adiposo in seguito all'eccessiva espansione di quest'ultimo, determini l'attivazione del processo infiammatorio tramite l'induzione del gene HIF1. Infatti, la delezione *in vitro* di questo gene negli adipociti previene l'infiammazione correlata all'obesità e l'insulino-resistenza.

Un altro potenziale meccanismo di innesco del processo infiammatorio può essere lo stress meccanico a cui sono sottoposte le cellule del grasso; gli adipociti interagiscono con la loro matrice extracellulare tramite delle *pathway* che governano il differenziamento e la proliferazione in risposta all'obesità (Saltiel and Jeroold, 2017).

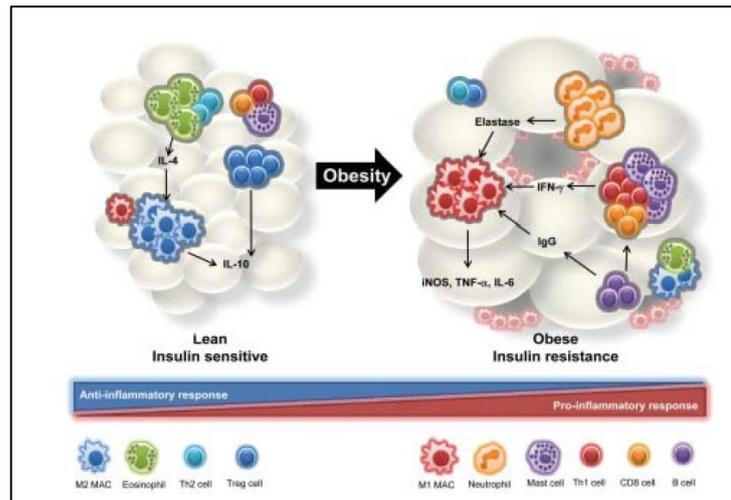
In aggiunta alle disfunzioni metaboliche negli organi periferici, l'obesità e l'infiammazione ad essa associata mostrano un collegamento con delle alterazioni a livello cerebrale, in particolare nelle aree che regolano l'omeostasi energetica e il metabolismo sistemico. L'ipotalamo controlla i circuiti neuroendocrini che includono il sistema della melanocortina che regola il fabbisogno di cibo e la spesa energetica. Questo fa sì che una dieta ricca di grassi possa indurre un processo infiammatorio a livello ipotalamico ancor prima che quest'ultimo si sviluppi negli organi periferici (Jais and Bruning, 2017).



**Figura 2:** l'infiammazione metabolica indotta da una dieta ricca di grassi coinvolge più organi quali tessuto adiposo, cervello, pancreas, fegato, intestino e muscoli (Duan et al., 2018)

Il tessuto adiposo gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi energetica sia fungendo da riserva per i trigliceridi sia tramite la secrezione di adipochine che lo rendono un importante organo endocrino (Fuentes et al., 2013).

Il tessuto adiposo è costituito da differenti tipi cellulari che includono adipociti, cellule staminali mesenchimali, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule del sistema immunitario, le quali possono essere categorizzate in cellule del sistema immunitario innato e cellule del sistema immunitario adattativo. Le prime comprendono macrofagi, neutrofili, eosinofili e mastociti, mentre le seconde includono i linfociti T e B e le cellule NK (*Natural Killer*). In un paziente sano, diverse cellule immunitarie anti-infiammatorie come i macrofagi di tipo M2, i linfociti T regolatori e gli eosinofili vengono attivati per il mantenimento della sensibilità all'insulina. Nei pazienti obesi, con il progredire della condizione patologica, il cambiamento in numero e attività delle cellule immunitarie è causa dell'instaurarsi dell'insulino-resistenza e della produzione di mediatori pro-infiammatori (Figura 3).



**Figura 3:** interazione delle cellule immunitarie con il tessuto adiposo (Huh et al., 2014).

Ma come interagiscono le cellule del sistema immunitario con il tessuto adiposo?

- ***Macrofagi:*** nel tessuto adiposo viscerale di un individuo sano rappresentano il 10% della frazione vasculo-stromale, mentre il loro numero può aumentare fino al 40-50% in un paziente obeso. I monociti si distinguono fondamentalmente in macrofagi attivati M1, “classicamente attivati” e pro-infiammatori, e macrofagi attivati M2, “alternativamente attivati” e anti-infiammatori; nel tessuto adiposo sano i macrofagi predominanti sono quelli di tipo M2 che secernono citochine anti-infiammatorie incluse IL-10 e IL-13. I linfociti Th2 producono citochine quali IL-4, IL-10 e IL-13, che stimolano il mantenimento dello stato M2. Al contrario, in pazienti obesi IFN- $\gamma$  e LPS guidano il differenziamento dei monociti reclutati in macrofagi di tipo M1 che secernono citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e MCP-1. Ciò contribuisce all’aumento dell’infiammazione nel tessuto adiposo e, inoltre, l’accumulo di macrofagi M1 si correla con l’insulino-resistenza.
- ***Neutrofili:*** sono i globuli bianchi più abbondanti del sistema immunitario e, data la loro emivita breve, rappresentano i primi effettori dell’infiammazione acuta. Pazienti obesi mostrano un significativo aumento di entrambe le proteine neutrofiliche mieloperossidasi e calprotectina, ad indicare un’infiltrazione elevata dei neutrofili nel tessuto adiposo. Ciò suggerisce che queste cellule siano implicate nella modulazione dell’infiammazione del tessuto adiposo nelle fasi iniziali dell’obesità.
- ***Mastociti:*** sono principalmente localizzati nelle mucose e nel tessuto connettivo dove agiscono come prima linea di difesa verso i patogeni. Recenti studi hanno dimostrato come i mastociti potrebbero regolare l’infiammazione nel tessuto adiposo (Liu et al., 2009). I mastociti contengono dei granuli al cui interno sono presenti mediatori come

istamina, serotonina, eparina, serin-proteasi, eicosanoidi e citochine, che in seguito ad un segnale di stimolazione vengono rilasciati mediando la risposta infiammatoria. Oltre ai mediatori appena indicati, i mastociti producono anche IL-6 e IFN- $\gamma$ .

- *Eosinofili*: presenti in uno stato immaturo quando circolanti, si infiltrano e maturano in un tessuto specifico. IL-3, IL-5 e GM-CSF sono necessari per l'attivazione e il differenziamento di queste cellule. Nel tessuto adiposo, gli eosinofili sono responsabili del 90% di espressione di IL-4 e accelerano la polarizzazione dei macrofagi M2 tramite la secrezione di IL-4 e IL-13. Probabilmente in condizioni di obesità e infiammazione del tessuto adiposo, queste cellule agiscono in senso anti-infiammatorio.
- *Linfociti T*: si sviluppano e maturano nel timo, e in seguito a stimolazione antigenica controllano la risposta immunitaria contro antigeni sconosciuti. Esistono differenti sottopopolazioni di linfociti T che includono i CD4, CD8 e cellule NK. Nei pazienti obesi, il numero totale di linfociti T è elevato e a ciò si associa un aumento della proliferazione e infiltrazione di fattori tessuto-specifici nel tessuto adiposo.
- *Linfociti B*: rappresentano i linfociti chiave della risposta immunitaria adattativa e di quella umorale. Queste cellule non producono citochine, ma agiscono come cellula presentante l'antigene. Nelle fasi iniziali dell'obesità si osserva un aumento nel numero di cellule B IgG+CD19+ ad indicare un accumulo di linfociti B maturi nel tessuto adiposo. Recentemente è stato riportato che questi linfociti B giocano un ruolo intermedio anti-infiammatorio contro l'infiammazione del tessuto adiposo tramite la via dell'IL-10 (Nishimura et al., 2013).

Come è già stato detto, gli adipociti rappresentano delle vere e proprie cellule endocrine in grado di secernere un'elevata varietà di adipochine sia pro-infiammatorie sia anti-infiammatorie. Il tessuto adiposo in pazienti obesi è caratterizzato da un accumulo di cellule del sistema immunitario innato e adattativo, fatto che comporta un aumento della secrezione di citochine e adipochine. Anche se l'innescò vero e proprio è ancora ad oggi dibattuto, molto probabilmente l'infiammazione inizia in seguito a segnali di stress cellulare dovuti ad un bilancio energetico positivo e ad uno stato generale di ipermetabolismo, soprattutto a carico degli adipociti. Queste cellule rispondono allo stress rilasciando chemochine che iniziano la risposta infiammatoria reclutando cellule immunitarie dai tessuti periferici, aumentando il proprio numero e le proprie dimensioni (iperplasia e ipertrofia) al fine di rispondere al quantitativo elevato di lipidi (Louwen et al., 2018).

L'ipertrofia degli adipociti determina un incremento della produzione di citochine/adipochine/chemochine pro-infiammatorie da parte degli adipociti stessi e di altre

cellule presenti nel tessuto adiposo. L'aumento di queste molecole innesca un effetto locale sull'endotelio, che a sua volta induce un aumento della produzione delle molecole di adesione vascolare e intercellulare (VCAM e ICAM), così come la permeabilità vascolare. Questo comporta la fuoriuscita dai vasi di fluidi e cellule (come i fagociti polimorfonucleati e mononucleati e altri tipi cellulari) verso il compartimento extracellulare.

Più nello specifico, le adipochine coinvolte sono principalmente la leptina e la resistina: la leptina attiva le cellule endoteliali e promuove l'accumulo dei macrofagi nel tessuto adiposo, i quali a loro volta rilasciano molecole pro-infiammatorie che perpetuano il processo flogistico; la resistina induce l'espressione delle molecole VCAM e ICAM sulle cellule vascolari endoteliali e promuove la sintesi e secrezione di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12.

Tra le cellule che infiltrano il tessuto adiposo, le più abbondanti sono i macrofagi, i quali vengono richiamati nel sito di infiammazione per la presenza delle citochine MCP-1 e TNF- $\alpha$ . Studi recenti suggeriscono che siano proprio i pre-adipociti i responsabili della produzione di MCP-1, ipotizzando che siano questi ad iniziare il processo infiammatorio nel tessuto adiposo.

Inoltre, la maggior parte dei macrofagi infiltranti sono di tipo M1 e rappresentano la principale fonte di citochine infiammatorie quali IL-8, IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , contribuendo direttamente all'infiammazione locale e sistemica. In condizioni fisiologiche, i macrofagi tessuto-residenti vengono mantenuti in uno stato definito M2, e cioè in grado di produrre IL-10 e altre citochine che contribuiscono al mantenimento della sensibilità all'insulina degli adipociti (Figura 4).

TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , inoltre, promuovono l'insulino-resistenza sia in maniera paracrina che autocrina, interferendo con il segnale dell'insulina nei tessuti periferici tramite l'attivazione di JNK e NF-Kb (Castro et al., 2016). Infatti, JNK e altre chinasi attivate in condizioni di stress possono inibire il segnale del recettore dell'insulina tramite la fosforilazione delle serine/treonine dei substrati del recettore in questione.

La correlazione tra obesità, infiammazione sub-clinica del tessuto adiposo e disfunzioni metaboliche rende la *pathway* infiammatoria un buon bersaglio per nuove terapie nell'ambito della sindrome metabolica.

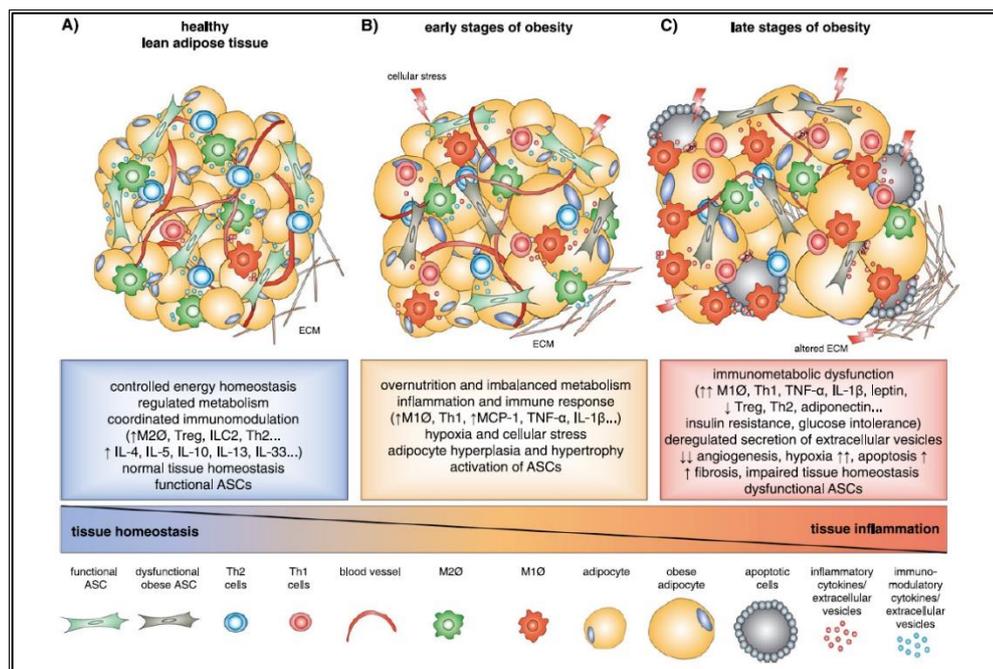


Figura 4: Alterazione del tessuto adiposo durante lo sviluppo dell'obesità (Louwen et al., 2018)

### 1.3.2 Cellule staminali adipose

Recenti studi (Zuk et al., 2002) hanno dimostrato che nel tessuto adiposo, a fianco di adipociti e cellule immunitarie, vi è un'altra popolazione di cellule, chiamate cellule staminali adipose o ASC (*Adipose Stem Cell*), le quali sono caratterizzate dall'espressione degli antigeni CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 e dall'assenza di CD45 e CD31. L'espressione di questi marker di superficie è molto simile a quella delle cellule staminali mesenchimali (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*), positive per CD90, CD73, CD105 e CD146 e negative per CD14, CD31, CD34 e CD106, e, come loro, le ASC sono in grado di differenziare in senso adipogenico, condrogenico ed osteogenico.

Le ASC contribuiscono direttamente all'omeostasi, al *cell renewal* e alla riparazione spontanea del tessuto adiposo, elementi che fanno sì che queste cellule siano particolarmente interessanti nell'ambito delle terapie rigenerative e immunomodulatorie per malattie autoimmuni e cardiovascolari. Esse rappresentano i regolatori cardinali del tessuto adiposo, il che fa supporre che, in caso di obesità, anche le loro funzioni risultino alterate (Figura 5).

L'obesità riduce la capacità di *self-renewal* delle ASC. Le ASC esprimono i principali geni della staminalità OCT4, SOX2 e NANOG, grazie ai quali tali cellule possono essere definite pluripotenti. ASC isolate da pazienti obesi mostrano una riduzione di espressione di questi geni e un aumento dei geni relativi all'adipogenesi e all'infiammazione rispetto a quelle isolate da

pazienti sani. Inoltre, ACTA2, gene che codifica per la proteina  $\alpha$ -SMA ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*), e correlato al differenziamento *multilineage*, è estremamente ridotto nelle ASC isolate da paziente obeso. Onate e colleghi suggeriscono che le ASC presenti nella nicchia del tessuto adiposo sottocutaneo di pazienti obesi siano estremamente indirizzate verso un differenziamento adipogenico e che mostrino un'iper-regolazione dei geni infiammatori associato alla perdita della multipotenza. Il tutto quindi comporta una ridotta capacità di *self-renewal*, dimostrata anche dal fatto che le ASC da pazienti obesi mostrano un'attività telomerasica alterata (Onate et al., 2013).

L'obesità altera la capacità di differenziamento delle ASC. È stato ampiamente dimostrato che il BMI (*Body Mass Index*) è strettamente correlato al potenziale osteogenico delle ASC. A supporto di ciò, le ASC isolate da tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo di pazienti obesi, *in vitro* differenziano molto meno in osteoblasti rispetto alle ASC di controllo. Ciò suggerisce che il differenziamento osteogenico negli obesi è compromesso e questo è in linea con l'evidenza clinica che l'obesità ostacoli la rigenerazione dell'osso e la guarigione dalle fratture.

In aggiunta, se le ASC in coltura in corso di differenziamento adipogenico vengono trattate con citochine pro-infiammatorie, derivanti da macrofagi del tessuto adiposo, si osserva un'inibizione dell'adipogenesi; in modo analogo le ASC da obesi mostrano una riduzione dell'accumulo di lipidi dopo l'induzione, suggerendo una perdita di capacità di differenziamento in senso adipogenico.

Il ridotto potenziale differenziativo delle ASC in un quadro di obesità è in parte attribuibile ai fattori pro-infiammatori. Infatti, un aumento delle citochine infiammatorie contribuisce, come è già stato menzionato, all'ipertrofia e all'iperplasia degli adipociti. Gli adipociti differenziati a partire da ASC di obeso secernono molta più IL-6 e leptina in misura maggiore rispetto agli adipociti da ASC di controllo. In più, viene alterata anche la produzione di citochine da parte delle ASC stesse, che secernono più citochine/chemochine pro-infiammatorie, danneggiando così il proprio potenziale di differenziamento e la capacità di rigenerazione (Lacasa et al., 2007).

L'obesità altera la capacità immuno-modulatoria e anti-infiammatoria delle ASC. Le MSC sono capaci di modulare il sistema immunitario e le loro capacità immunosoppressive dipendono dalla loro abilità nell'inibire la proliferazione e la produzione di citochine dei linfociti.

Come le MSC, anche le ASC mostrano questa capacità inibendo la proliferazione delle cellule NK e dei linfociti T, essendo altresì dotate di un'attività fagocitaria. In aggiunta, mentre gli adipociti producono principalmente leptina e adiponectina, le ASC e i pre-adipociti producono

IL-6 e TNF- $\alpha$ ; quest'ultimo a sua volta stimola la produzione da parte delle ASC di IL-6, IL-8 e MCP-1, mentre il lipopolisaccaride stimola le ASC a produrre IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Questo dimostra come tali cellule siano estremamente responsive nei confronti dell'ambiente che le circonda, il che comporta che in pazienti obesi (dove vi è un ambiente infiammatorio cronico) le proprietà immuno-modulatorie delle ASC siano compromesse: maggiore produzione di citochine pro-infiammatorie, perdita dell'attività immunosoppressiva e di attivazione dei macrofagi M2 (Louwen et al., 2018).

L'obesità riduce la capacità angiogenica delle ASC. Le cellule staminali del tessuto adiposo sono in grado di differenziare in senso endoteliale e di formare vasi sanguigni *in vivo*. Inoltre, le ASC secernono molti fattori pro-angiogenici tra i quali VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) e FGF (*fibroblast growth factor*), che stimolano in maniera specifica la neovascolarizzazione *in vivo* e la formazione di vasi *in vitro*.

Le ASC derivanti da pazienti obesi mostrano una riduzione del potenziale angiogenico, osservazione dimostrata dal fatto che vi è una ridotta produzione di VEGF causata da una bassa attivazione della *pathway* di Erk1/2, essenziale nel processo di induzione dell'angiogenesi.

Un altro aspetto interessante è che in condizioni di ipossia, le ASC derivanti da pazienti obesi con sindrome metabolica subiscono una riduzione del potenziale angiogenico, tramite una ridotta secrezione di citochine quali VEGF e HGF, rispetto ad ASC da pazienti obesi, senza sindrome metabolica, a conferma del fatto che per mantenere una capacità angiogenica è necessario uno stato metabolico normale (Oliva-Olivera et al., 2017).

L'obesità altera la motilità delle ASC. Le MSC sono in grado di migrare verso l'area di danno tissutale, richiamate da differenti citochine e fattori di crescita. Come le MSC anche le ASC sono mobili e la loro migrazione può essere incentivata da fattori di crescita come il TGF- $\beta$ 1 e da citochine come il TNF- $\alpha$ . È interessante notare che le ASC da donatore obeso mostrano un'alterata capacità di migrazione e di invasione; nello specifico sembra che nelle fasi iniziali dell'obesità tali cellule mantengano la capacità di migrare, che viene però persa nelle fasi più tardive, in cui non sono più in grado di rispondere agli stimoli e quindi di regolare il proprio movimento (Louwen et al., 2018).

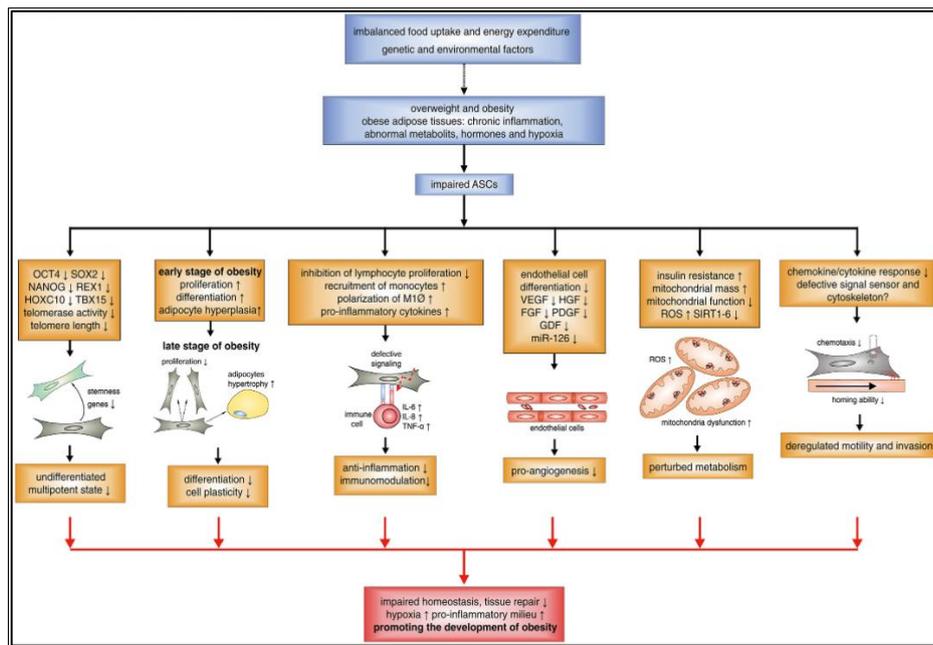


Figura 5: rappresentazione schematica delle alterazioni delle ASC in condizioni di obesità (Louwen et al., 2018)

## 1.4 Strategie terapeutiche per la sindrome metabolica

Poiché la sindrome metabolica è una patologia multifattoriale, le strategie volte a ridurre il rischio di patologie cardiovascolari in pazienti con tale malattia dovrebbero coinvolgere tutti i fattori di rischio.

Il cambiamento dello stile di vita è uno dei primi approcci da adottare in caso di sindrome metabolica: numerose evidenze hanno dimostrato come un aumento dell'attività fisica e un cambiamento nella dieta riducano il rischio di diabete del 39-58% (Pan et al., 1997). In particolare una regolare attività fisica riduce il rischio di malattie cardiovascolari associate all'insulino-resistenza; infatti, individui con sindrome metabolica fisicamente attivi mostrano un profilo metabolico nettamente migliore con basse concentrazioni di indicatori infiammatori come il CRP, rispetto ad individui sedentari.

Inoltre, anche modifiche della dieta possono apportare miglioramenti in pazienti con sindrome metabolica: una dieta ricca di fibre (frutta, verdura) e povera di grassi migliora significativamente la pressione sanguigna, i trigliceridi e il *turn-over* del glucosio. Nello specifico, la dieta mediterranea è associata ad un ridotto rischio di mortalità per malattie cardiovascolari: in un trial clinico recente, in pazienti con la sindrome metabolica che abbiano seguito questo tipo di dieta si osserva un netto calo di peso, un abbassamento della pressione, della glicemia, del colesterolo totale, dei trigliceridi, e dei fattori infiammatori come CRP, IL-6 e IL-18 (Esposito et al., 2004).

Rientra nello stile di vita anche il fumo, il quale è un fattore di rischio importante per aterosclerosi e malattie cardiovascolari. Sembra infatti esserci una correlazione dose-dipendente tra il fumo e la sindrome metabolica in quanto i fumatori risultano più resistenti all'insulina rispetto ai non fumatori e inoltre, il fumo è associato ad un aumento di concentrazione nel plasma di M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), CRP e piastrine attive.

Il cambiamento dello stile di vita non è però sufficiente come unica terapia per la sindrome metabolica, essendo difficile da ottenere e mantenere; è quindi necessario un intervento farmacologico specifico e direzionato a curare le alterazioni che aumentano il rischio di malattie cardiovascolari.

Terapia antipertensiva: farmaci antipertensivi attualmente utilizzati, inclusi diuretici e beta-bloccanti, sebbene utili nel controllo della pressione sanguigna possono potenzialmente causare un peggioramento della sindrome metabolica o aumentare il rischio di diabete di tipo 2 (Ames et al., 1996). Per tale motivo sono state altre le classi di farmaci sperimentati nella terapia per la sindrome metabolica: gli inibitori dell'enzima che converte l'angiotensina (ACE-Is) e i bloccanti del recettore dell'angiotensina (ARBs), i quali hanno un effetto vasculo-protettivo e renoprotettivo. Tra questi troviamo il ramipril, un ACE-I che riduce significativamente il rischio di morte cardiovascolare del 26% comparato al placebo; inoltre il ramipril abbassa il rischio di infarto del miocardio del 22%, di arresto cardiaco del 33% e di morte cardiovascolare del 37% in pazienti con diabete.

Terapia ipolipemizzante: secondo le linee guida del NCEP-ATPIII, la concentrazione di LDL è il primo target della terapia. Le statine, farmaco di punta nella terapia ipolipemizzante, riducono gli eventi cardiovascolari in pazienti con sindrome metabolica; esse agiscono con un'azione pleiotropica in quanto modulano le risposte infiammatoria, ossidativa e trombotica. Nello specifico tre statine (pravastatina, simvastatina e atorvastatina) inducono una riduzione di concentrazione della CRP in pazienti con iperlipidemia (Qiao et al., 2007).

Terapia ipoglicemizzante e insulino-sensibilizzante: ad oggi vi sono due tipi di farmaci che hanno come target l'insulino-resistenza e sono i biguanidi (metformina) e i tiazolidinedioni (TZDs), agonisti del recettore di PPAR gamma. La metformina determina un miglioramento delle funzioni endoteliali nei pazienti con sindrome metabolica; i TZDs migliorano la sensibilità all'insulina e abbassano la concentrazione di glucosio nei pazienti con diabete e sindrome metabolica. Questi farmaci possono dunque avere un ruolo nella gestione della sindrome metabolica, nonostante l'epatotossicità del troglitazone e gli effetti indesiderati quali aumento di peso ed edema. Della stessa famiglia di farmaci fanno parte anche il rosiglitazone, che abbassa

la concentrazione dei marker infiammatori e migliora le funzioni dell'endotelio, e il pioglitazone associato ad un significativo miglioramento delle dimensioni delle particelle di trigliceridi, LDL e HDL (Goldberg et al., 2005).

Terapia anti-obesità: orlistat è un inibitore della lipasi gastrointestinale che riduce l'assorbimento dei lipidi nell'intestino, il che comporta perdita di peso, e miglioramento della dislipidemia. Inoltre, l'utilizzo di questo farmaco riduce significativamente l'incidenza del diabete di tipo 2 del 37,5% confrontato con il placebo. Se orlistat viene associato ad uno stile di vita sano e ad una dieta ipocalorica si osserva un miglioramento del 35% dei fattori di rischio della sindrome metabolica rispetto a pazienti che seguono solo una dieta ipocalorica. Questi risultati suggeriscono che la farmacoterapia per l'obesità dovrebbe essere utilizzata in aggiunta, piuttosto che come sostituto dei cambiamenti dello stile di vita.

Un'altra classe di farmaci utilizzata in questo tipo di terapia sono gli endocannabinoidi, i quali sembrano avere un ruolo chiave nella regolazione a livello centrale e periferico del bilancio energetico, nell'accumulo di grasso e nel metabolismo dei lipidi e del glucosio. Tra questi quello più utilizzato è il rimonabant, che è associato ad un significativo aumento della concentrazione plasmatica di adiponectina e ad un significativo calo della concentrazione plasmatica di leptina e CRP. Gli eventi avversi riportati come nausea, diarrea e disturbi dell'umore sono di solito transienti e moderati e sono presenti solo durante il periodo di trattamento (Van Gaal et al., 2005).

Terapia antiplastrinica: l'aspirina è usata ampiamente nella prevenzione degli eventi cardiovascolari in popolazioni ad alto rischio. Questo farmaco riduce la concentrazione di CRP e IL-6, ma la dose di aspirina richiesta per raggiungere l'effetto anti-infiammatorio massimo rimane ancora sconosciuta (Ridker et al., 1997).

Una delle considerazioni più importanti nello sviluppo di farmaci per la sindrome metabolica è riassunta da questa domanda: la sindrome metabolica è effettivamente una nuova patologia o semplicemente un nuovo nome per identificare dei fattori di rischio già esistenti? A tal proposito l'FDA (*Food and Drug Administration*) ha dichiarato che per lo sviluppo di farmaci non si deve considerare necessariamente la sindrome metabolica come una malattia distinta e che il prodotto terapeutico volto a trattare tale patologia deve normalizzare o migliorare tutti i componenti della sindrome, indipendentemente dalla perdita di peso, e infine deve dimostrare di riuscire a prevenire il diabete e ridurre la mortalità per CVD.

Da tutte queste considerazioni nasce la spinta a trovare un farmaco che sia in grado di contenere tutti i principi attivi indirizzati verso i differenti fattori di rischio della sindrome

metabolica: la cosiddetta *polypill*. Il progetto iniziale della *polypill* vedeva la combinazione di aspirina, un beta-bloccante, un ACE-Inibitore, una statina, un diuretico e acido folico in un'unica pastiglia. Argomenti a favore di questo farmaco vedono un miglioramento della *compliance* e una riduzione dei costi per il paziente e per la società. Allo stesso tempo, però, essendo la *polypill* un farmaco *multitarget*, c'è il rischio di trattare pazienti con terapie di cui non hanno bisogno; in più, nel caso in cui un paziente mostrasse un evento avverso, sarebbe difficile identificare il colpevole. Nonostante queste considerazioni, numerose *polypill* sono tutt'ora in via di sviluppo (Matfin et al., 2010).

#### 1.4.1 Terapia anti-infiammatoria

Per ora sono stati descritti approcci terapeutici che mirano a migliorare quelli che sono i principali fattori di rischio che descrivono la sindrome metabolica e che sono comuni allo sviluppo di malattie cardiovascolari. Ma non bisogna dimenticare che alla base di obesità, sindrome metabolica, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari vi è un'inflammatione cronica silente. Sulla base di ciò viene naturale pensare ad un approccio farmacologico che abbia come goal l'attenuazione di questo processo infiammatorio, utilizzando strategie terapeutiche che abbiano come target i principali promotori dell'inflammatione (per esempio TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6).

La terapia anti-TNF- $\alpha$ , basata principalmente su anticorpi monoclonali specifici (infliximab, adalimumab), è ad oggi utilizzata con successo in malattie infiammatorie come l'artrite reumatoide, la psoriasi e il morbo di Crohn. Studi pilota sull'utilizzo di questa terapia in pazienti con sindrome metabolica hanno dimostrato che la neutralizzazione di TNF- $\alpha$  migliora la sensibilità all'insulina e riduce il glucosio plasmatico, in associazione con una riduzione dei marker infiammatori come CRP e IL-6.

Un altro approccio interessante è la terapia anti-IL-1: questa famiglia di citochine gioca un ruolo centrale nella regolazione della risposta immunitaria e infiammatoria ed è principalmente costituita da due citochine pro-infiammatorie, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Nello specifico IL-1 $\beta$  è coinvolta nell'inflammatione associata all'obesità e probabilmente anche nei processi aterotrombotici, quindi per tale motivo essa rappresenta un target terapeutico al fine di evitare le conseguenze metaboliche dell'obesità come il diabete di tipo 2. Sono tre i farmaci che hanno come target IL-1 e che sono stati approvati per il trattamento delle malattie infiammatorie: anakinra (antagonista del recettore dell'IL-1), canakinumab (anticorpo monoclonale anti-IL-1) e gevokizumab (anticorpo anti-IL-1 che modula negativamente il *signaling* dell'IL-1 $\beta$  tramite un meccanismo allosterico). Il trattamento con anakinra diminuisce significativamente i livelli dei

marker infiammatori come CRP e il numero dei leucociti, migliora la funzionalità delle cellule beta pancreatiche, ma non la sensibilità all'insulina in pazienti con sindrome metabolica. Anche i trattamenti con canakinumab e gevokizumab hanno dato risultati promettenti in termini di azione anti-infiammatoria, meno per quanto riguarda l'assetto lipidico e il metabolismo del glucosio.

Infine un altro possibile target terapeutico molto importante è l'IL-6, la quale è conosciuta come la citochina pro-infiammatoria predominante e in quanto tale come conduttore dell'infiammazione in pazienti obesi, ed è inoltre strettamente correlata con un aumento del rischio di mortalità per malattie cardiovascolari. Bloccando il segnale dell'IL-6 si può, quindi, prevenire il processo infiammatorio; allo stesso tempo la comprensione degli effetti dell'IL-6 sulla sensibilità all'insulina in pazienti con diabete di tipo 2 rimane ancora complessa, pertanto utilizzarla come target per promuovere l'azione dell'insulina non è per ora indicato.

Per quanto questo tipo di terapie possano rappresentare una svolta nella cura di patologie che hanno alla base un'infiammazione cronica, bisogna sempre tenere in considerazione alcuni punti importanti: l'efficacia rispetto ad altre terapie, la sicurezza del farmaco e, da ultimo ma non meno importante, il costo del trattamento. Ad esempio, uno dei principali vantaggi degli agenti anti-infiammatori è che non sono associati ad un alto rischio di ipoglicemia, una complicanza che è tra le principali in seguito all'assunzione di medicinali per mantenere il controllo del glucosio; allo stesso tempo la complessità dei meccanismi che stanno dietro al processo infiammatorio fa sì che anche le strategie terapeutiche appena descritte abbiano target differenti e quindi si potrebbe pensare, anche in questo caso, ad una terapia multi-target, associando più strategie anti-infiammatorie in una.

Il diabete di tipo 2 è una malattia cronica progressiva, e l'aspettativa di vita dei pazienti che ne sono affetti sta aumentando, di conseguenza la sicurezza della terapia è di estrema importanza in quanto deve essere assunta per lunghi periodi. Molti farmaci anti-infiammatori valutati per il trattamento del diabete vengono già utilizzati per altre patologie, per cui la loro sicurezza è già stata testata. Inoltre diverse valutazioni cliniche sostengono come sia possibile affrontare l'infiammazione senza aumentare eccessivamente il rischio di infezione o di cancro, e senza andare incontro a tossicità, effetti collaterali che possono essere correlati a questo tipo di terapia (Esser et al., 2014).

#### **1.4.2 Un nuovo approccio terapeutico: *Low Dose Medicine***

Nonostante gli effetti positivi delle strategie terapeutiche appena descritte e il corretto rationale su cui si basano, l'utilizzo farmacologico di queste molecole reattive, quando impiegate ad alti

dosaggi e per lungo tempo, risulta comunque limitato a causa dei numerosi effetti collaterali, come nel caso dell'infliximab, che è molto utilizzato nel trattamento dell'artrite reumatoide, ma particolarmente dannoso per altre malattie autoimmuni come la sclerosi multipla. Questi farmaci possono aumentare il rischio di infezione e di alcuni tipi di tumore della pelle.

Recenti studi hanno evidenziato che l'utilizzo di bassi dosaggi di citochine mostra minori effetti collaterali associati ad un maggior beneficio nel trattamento di alcune patologie autoimmuni, rispetto all'utilizzo delle dosi standard di citochine ricombinanti. Per esempio si è osservato un maggiore beneficio nel trattamento della psoriasi rispetto all'utilizzo delle dosi standard di citochine ricombinanti (i.e. il farmaco anti-TNF $\alpha$  infliximab) (Barygina et al., 2015). Ma non solo, un altro studio *in vitro* ha dimostrato una capacità immunomodulatoria della citochina IFN- $\gamma$  *low dose*, tale per cui è stata proposta come nuovo approccio per migliorare l'attività antitumorale di cellule NK in pazienti con carcinoma del colon (Radice et al., 2014).

Sulla base di queste evidenze scientifiche nasce questo progetto di dottorato, finanziato dalla GUNA S.p.a., azienda leader nel settore dell'omeopatia e della medicina *Low Dose*.

La *Low Dose Medicine (LDM)* si basa sull'utilizzo di dosaggi sub-nanomolari di citochine, fattori di crescita, ormoni e neuropeptidi in grado di produrre gli stessi effetti biologici ascrivibili alle alte dosi. Il principale pilastro della LDM è il recupero e/o il mantenimento delle originarie condizioni fisiologiche avendo come bersaglio l'eziologia della patologia e non solo la sintomatologia. In altre parole la LDM ha come obiettivo quello di riportare l'organismo malato alle condizioni fisiologiche originali attraverso l'utilizzo delle molecole segnale normalmente presenti nel corpo e che, in condizioni di salute, controllano e guidano le varie funzioni organiche.

Classicamente la dose minima attiva per queste molecole viene indicata generalmente fra la più bassa farmacologicamente attiva ( $10^{-5}$ ) e la massima concentrazione fisiologica ( $10^{-6}$ ). La farmacologia *low dose* si muove invece all'interno della gamma di concentrazioni fisiologiche delle molecole segnale ( $10^{-9}$ - $10^{-15}$ ) operando, quindi, al di sotto delle concentrazioni alle quali appaiono gli effetti avversi ma raggiungendo ugualmente risultati terapeutici apprezzabili. Le proprietà del legame ligando-recettore sono fondamentali per spiegare come le molecole segnale *low dose* possano essere efficaci. L'affinità del recettore per il suo ligando specifico è fondamentale per l'attivazione delle *pathway* di segnale a valle del recettore stesso; in condizioni di saturazione del ligando, infatti, generalmente viene indotto il blocco recettoriale e/o la sua *down-regulation*. Le molecole a basso dosaggio sono in grado di indurre una stimolazione

recettoriale fisiologica diretta sulle cellule immunitarie modulando la risposta all'interno di un *range* omeostatico.

Una criticità associata all'assunzione di queste molecole a basso dosaggio è rappresentata dalla loro bassa biodisponibilità, quindi è necessario un efficace *drug delivery system*. Una tecnologia, ideata e standardizzata nei laboratori GUNA S.p.a., chiamata tecnologia SKA (*Sequential Kinetic Activation*), si basa sulla *release activity*, cioè la capacità di rilasciare la loro attività nel mezzo acquoso. Secondo l'azienda produttrice, la tecnologia SKA permette alle nano concentrazioni di essere attive anche al di sotto della dose attualmente ritenuta essere la minima efficace, con risultati terapeutici paragonabili a quelli ottenuti con le alte concentrazioni (Dip. Scientifico GUNA, 2017).

Più di dieci anni di ricerca scientifica nel campo della *Low Dose Medicine* hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza dell'intervento terapeutico basato sulla somministrazione orale di dosi basse di molecole messaggere attivate: il primo articolo sugli effetti delle citochine *Low dose SKA* risale al 2009 in cui vennero testate su un modello *in vivo* nell'ambito dell'asma allergico (Gariboldi et al., 2009), a cui sono susseguiti numerosi lavori nei diversi campi della medicina quali per esempio dermatologia (Barygina et al., 2016), gastroenterologia (Cardani et al., 2013) e reumatologia (Martin et al., 2017).

Poiché come è già stato descritto in precedenza, il player principale della sindrome metabolica è un'inflammatione cronica di basso grado, l'azienda GUNA ha mostrato interesse nel voler testare in questo ambito l'utilizzo di citochine *low dose*, in particolare IL-4, IL-10 e MELATONINA attivate con la tecnologia SKA. Nello specifico, IL-10 è la più potente citochina antinfiammatoria di cui dispone l'organismo, esercitando un'azione immunomodulatoria, attraverso l'attivazione della *pathway* JAK/STAT; nell'obesità si ha una diminuzione della sua sintesi, probabilmente dovuta alla riduzione delle cellule beta, causata dallo stress ossidativo e dagli eventi apoptotici che avvengono nell'organo (Gotoh et al., 2017). IL-4, invece, viene prodotta dai linfociti T CD4<sup>+</sup> Th2, rappresenta il primo stimolo alla produzione di anticorpi IgE e allo sviluppo di cellule Th2 da linfociti T *helper* CD4<sup>+</sup> naive. Questa citochina si è dimostrata efficace nel modulare la risposta infiammatoria sia cronica sia acuta, anche mediando l'iper-regolazione di IL-10 (Say, 2017). La melatonina, invece, è una molecola coinvolta in moltissime vie metaboliche dell'organismo, tra le quali la corretta sintesi e secrezione di insulina; infatti, una riduzione di melatonina induce insulino-resistenza, intolleranza al glucosio, disturbi del sonno e obesità (Cipolla-Neto et al., 2014).

## 2. SCOPO

In questo progetto si andrà a testare l'utilizzo di citochine a basso dosaggio nell'ambito della sindrome metabolica, come possibile cura dell'infiammazione cronica che, come descritto in precedenza, si trova sia tra le cause sia tra gli effetti di queste patologie. Si procederà a una valutazione del trattamento a lungo termine con citochine a basso dosaggio *in vitro* sui diversi tipi cellulari coinvolti nella genesi e/o nella progressione della malattia metabolica.

In particolare, date queste premesse, si andranno a studiare:

- cellule pre-adipocitarie e adipocitarie, data l'importanza che il coinvolgimento di questo tessuto ha nella progressione della malattia metabolica. In particolare si sono individuate come modello da testare in un primo momento cellule pre-adipocitarie murine (3T3-L1);
- cellule staminali adipose (ASC), le quali, come descritto nell'introduzione, rappresentano un regolatore fondamentale del tessuto adiposo, e la cui funzionalità appare alterata in pazienti obesi.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Citochine

In questo studio sono state utilizzate le seguenti citochine, fornite dalla ditta GUNA S.p.a., tutte attivate secondo la metodica SKA, descritta nell'introduzione: GUNA®-Interleukin 4 (IL-4), GUNA®-Interleukin 10 (IL-10), GUNA®-Melatonin, GUNA®-Melatonin + GUNA®-IL-4.

Al momento della semina (G0) le cellule vengono mantenute in coltura somministrando giornalmente una dose di citochine nell'ordine dei 2 fg ogni  $10^6$  cellule.

### 3.2 Modelli cellulari

#### 3.2.1 Linea di pre-adipociti murini (3T3-L1)

Le 3T3-L1 sono una linea cellulare di fibroblasti murini 3T3-NIH, in grado di differenziare in adipociti se opportunamente stimolate. Esse vengono mantenute in coltura in terreno DMEM High Glucose (*Euroclone*) addizionato di antibiotici (Penicillina-Streptomycina 1%, *Euroclone*), L-glutammina (4 mM, *Euroclone*) e FBS dializzato (10%, *Euroclone*) e fatte crescere a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.2 Cellule staminali adipose (ASC)

Le cellule staminali adipose utilizzate in questo studio sono state isolate a partire da campioni di tessuto provenienti da addominoplastica in accordo con il comitato etico dell'Ospedale Sant'Orsola Malpighi di Bologna (FATGRAFTING-01, EM468-2019, 6/2016/U/Tess/AOUBO).

Lo strato sottocutaneo del tessuto adiposo viene separato meccanicamente tramite l'utilizzo di forbici dalla parte di derma/epidermide, quindi triturato e processato tramite un trattamento enzimatico con Collagenasi di tipo II (0.075%, *Sigma-Aldrich*) per 30 minuti a 37°C in agitazione. In seguito, il tessuto digerito viene lavato con PBS, filtrato su uno strainer di 100 µm (*Corning*), al fine di isolare le cellule dalla matrice tissutale, e centrifugato. A questo punto il pellet ottenuto viene sottoposto ad un procedimento di emolisi per eliminare i globuli rossi, lavato e centrifugato. Le ASC isolate vengono poi seminate e mantenute in coltura in DMEM-LG (DMEM Low Glucose, *Euroclone*) addizionato di antibiotici (Penicillina-Streptomycina 1%, *Euroclone*), L-glutammina (2 mM, *Euroclone*) e FBS (10%, *Euroclone*) e fatte crescere a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Caratterizzazione fenotipica: le ASC sono cellule mesenchimali definite dall'espressione di marker specifici (CD73, CD90 e CD105) e dall'assenza di marcatori emopoietici o endoteliali. Per tale motivo le cellule sono state mantenute in coltura fino al 3° passaggio, quindi sono state analizzate in citofluorimetria per valutare il fenotipo, investigando i cluster CD34, CD31, CD29, CD73, CD90, CD105. Per l'analisi citofluorimetrica sono stati acquisiti 10<sup>4</sup> eventi per saggio tramite Attune NxT® Flow Cytometer e l'analisi è stata eseguita con il software FlowJo.

### 3.2.3 Altri tipi cellulari

Nell'ambito di questo studio sono stati utilizzati altri due tipi cellulari, isolati entrambi presso il nostro laboratorio: le cellule mesenchimali da derma (MSC) e le cellule endoteliali della vena ombelicale (HUVEC), essenziali per la realizzazione di alcuni saggi *in vitro*.

Le MSC sono state isolate a partire da campioni di tessuto provenienti da addominoplastica in accordo con il comitato etico dell'Ospedale Sant'Orsola Malpighi (FATGRAFTING-01, EM468-2019, 6/2016/U/Tess/AOUBO). Lo strato di derma/epidermide separato dallo strato sottocutaneo (come descritto sopra per l'isolamento delle ASC) viene pulito delicatamente e, tramite l'utilizzo di un punch, vengono isolate 12 biopsie. Queste ultime sono poi triturate e digerite in una soluzione di Collagenasi II (0.075%, *Sigma-Aldrich*) e Collagenasi I (1%, *Sigma-Aldrich*) per 2 ore nel bagnetto termostato a 37°C. Al termine della digestione viene aggiunto PBS e il campione viene centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti. Le MSC così isolate vengono poi seminate e mantenute in coltura in DMEM-LG (*Euroclone*) addizionato di antibiotici (Penicillina-Streptomicina 1%, *Euroclone*), L-glutammina (2 mM, *Euroclone*) e FBS (10%, *Euroclone*) e fatte crescere a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Le HUVEC sono state isolate a partire dal cordone ombelicale ottenuto da parti cesarei elettivi in accordo con il comitato etico dell'Ospedale Sant'Orsola Malpighi (protocollo n° 2481/2017, ref n° 68/2017/U/Tess). Le cellule sono mantenute in coltura in terreno EGM-2 (*Lonza*) a 37° con il 5% di CO<sub>2</sub>.

## 3.3 Valutazione della crescita cellulare

La crescita cellulare è stata valutata con il saggio MTT, a partire dal G0 fino al G4. Le cellule sono state seminate in una piastra multiwell da 24 pozzetti ad una densità di 4000 cellule/cm<sup>2</sup> per le 3T3-L1, e di 3000 cellule/cm<sup>2</sup> per le ASC.

L'MTT (sale di tetrazolio, 0.5 mg/mL, *VWR*) viene addizionato alle cellule e mantenuto in incubazione per 3 ore a 37°C. Durante questo periodo, le cellule vitali metabolizzano l'MTT convertendolo in sali di formazano di colore violetto. A questo punto viene aggiunto il Lysis Buffer (HCl 0.01 M-SDS 10%) e mantenuto in incubatore a 37°C O/N; dopo l'incubazione i cristalli sono solubilizzati e si procede con la lettura spettrofotometrica a 575 nm caricando 100 µL di ogni campione in doppio in una piastra da 96 pozzetti.

Il saggio MTT rappresenta un metodo indiretto di valutazione della vitalità cellulare basato sulla funzionalità mitocondriale: tale test si basa infatti sulla riduzione dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (SDH) in cristalli di formazano. La formazione dei cristalli avviene solo nelle cellule metabolicamente attive per cui è un dato correlabile alla vitalità cellulare.

### **3.4 Valutazione del fenotipo cellulare in immunofluorescenza**

Le cellule 3T3-L1 vengono seminate su vetrino all'interno di una piastra da 24 pozzetti e mantenute in coltura in presenza di citochine per 8 giorni (G8). Successivamente, il terreno viene eliminato e vengono effettuati due lavaggi in PBS, quindi le cellule vengono fissate in paraformaldeide (PFA 4%, *VWR*) per 15 minuti a temperatura ambiente (TA). Dopo la fissazione, le cellule vengono lavate con DPBS/0.25% Tween 20 (*VWR*) e permeabilizzate con Triton X-100 (*PanReac AppliChem*) a TA per 10 minuti. La saturazione dei siti di legame aspecifici per l'anticorpo avviene tramite un'incubazione in 4% BSA (albumina sierica bovina, *Sigma-Aldrich*) in PBS per 1 ora a TA. Le cellule vengono poi incubate O/N a 4°C in una camera umida in presenza degli anticorpi primari Vimentina (1:400, *Cell Signaling*) e N-caderina (1:400, *Origene*). Il giorno successivo, dopo tre lavaggi in DPBS/0.25% Tween 20, le cellule sono incubate con gli anticorpi secondari anti-mouse (*Invitrogen*) e anti-rabbit (*Invitrogen*) per 1 ora a TA. I nuclei vengono colorati con NucBlue® Fixed Cell ReadyProbes® Reagent (*Molecular Probes™, Life Technologies*). I campioni con le cellule fissate vengono montati con Prolong™ Glass antifade Mountant (*Invitrogen*) e osservati al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ti2 (*Nikon*).

### **3.5 Differenziamento adipogenico**

#### **3.5.1 3T3-L1**

Al giorno 6 (G6) le cellule vengono staccate, seminate nuovamente in piastre da 48 pozzetti ad una densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in terreno completo con aggiunta giornaliera di

citochine. Dopo due giorni dalla semina (G8) le cellule sono trattate con il terreno di induzione per il differenziamento adipocitario, composto da terreno completo addizionato di Desametasone (1  $\mu$ M, *Sigma-Aldrich*), IBMX (0.5 mM, *Sigma-Aldrich*) ed Insulina (10  $\mu$ g/ml, *Sigma-Aldrich*) per 48 ore.

Le cellule 3T3-L1 sono mantenute in coltura fino all'analisi in terreno di mantenimento (DMEM HG 10% + FBS dializzato + Insulina 5  $\mu$ g/ml).

Il trattamento con citochine viene ripetuto ogni giorno, mentre il terreno di mantenimento viene cambiato a giorni alterni.

### 3.5.2 ASC

Al giorno 8 (G8) le cellule vengono staccate, seminate nuovamente in piastre da 48 pozzetti o in petri di diametro 6 cm (a seconda del tipo di analisi che si vuole effettuare) ad una densità di 9000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in terreno completo con aggiunta giornaliera di citochine. Dopo due giorni dalla semina (G10) le cellule sono trattate con il terreno di induzione per il differenziamento adipocitario, composto da terreno completo addizionato di Desametasone (1  $\mu$ M, *Sigma-Aldrich*), IBMX (0.5 mM, *Sigma-Aldrich*), Insulina (10  $\mu$ g/ml, *Sigma-Aldrich*) e Indometacina (1  $\mu$ M, *Sigma-Aldrich*).

Il trattamento con citochine viene ripetuto ogni giorno, mentre il terreno di induzione viene cambiato a giorni alterni.

## 3.6 Valutazione dell'adipogenesi e della lipolisi

Per valutare l'adipogenesi sono stati utilizzati principalmente due saggi: la quantificazione del colorante Oil Red O (*Sigma-Aldrich*) e l'*Adipogenesis Detection Assay Kit (Abcam)*. Mentre, per quanto riguarda la valutazione della lipolisi, è stato utilizzato il *Lipolysis Assay Kit (Abcam)*.

### Colorazione Oil Red O

Al termine del differenziamento, il surnatante viene rimosso e le cellule vengono lavate con PBS per poi essere fissate con PFA 4% per 15 minuti a TA. Al termine dell'incubazione, si rimuove la PFA e si aggiungono 250  $\mu$ L di ORO *working solution* (2 parti di Oil Red O *stock solution* + 3 parti di acqua distillata) per pozzetto, lasciati incubare per 30 minuti a TA. Al termine della colorazione si effettuano 5 lavaggi con acqua distillata; a questo punto si possono acquisire le immagini al microscopio (*Nikon Eclipse Ti2*).

Per l'analisi quantitativa allo spettrofotometro è necessario eluire il colorante e per farlo si aggiungono 500  $\mu$ L di 2-propanolo (100%, *VWR*) e si lascia incubare 10 minuti a TA su un

agitatore orbitale. Quindi si trasferiscono 200  $\mu$ L in doppio in una piastra da 96 pozzetti e si effettua la lettura allo spettrofotometro a 520 nm.

#### **Adipogenesis Detection Assay Kit**

Si tratta di un saggio colorimetrico che permette di quantificare l'accumulo di trigliceridi nelle cellule e nei tessuti: i trigliceridi vengono solubilizzati e idrolizzati a glicerolo, che successivamente è in grado di ossidare un *probe* cromogenico (O.D. = 570 nm).

Il protocollo è stato eseguito seguendo le indicazioni fornite dal kit.

#### **Lipolysis Assay Kit**

La lipolisi è l'idrolisi dei trigliceridi in glicerolo ed FFA, che vengono rilasciati dalle cellule nel medium di coltura. Il kit contiene catecolamina sintetica ed isoproterenolo, i quali attivano i recettori  $\beta$ -adrenergici che inducono l'attivazione dell'adenilato ciclasi, responsabile della conversione di ATP in cAMP. Quest'ultimo funge da secondo messaggero per attivare la lipasi ormone-sensibile, la quale idrolizza i trigliceridi. Nello specifico il saggio misura il glicerolo rilasciato dalle cellule tramite un'analisi colorimetrica in cui l'intensità del colore è direttamente proporzionale al quantitativo di glicerolo.

Il protocollo è stato eseguito seguendo le indicazioni fornite dal kit.

### **3.7 Western Blot**

Le cellule vengono lisate utilizzando il Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER, *Thermo Fisher Scientific*) addizionato con inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (*Sigma-Aldrich*). Dopo la lisi, le proteine vengono quantificate tramite il Bradford Reagent (*Sigma-Aldrich*). Il lisato cellulare è quindi risospeso in Laemmli Sample Buffer 4x (*Bio-Rad*) e bollito per 5 minuti. Dieci  $\mu$ g di proteina sono caricati su un gel 4-20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Protein Gels (*Bio-Rad*) insieme ad un marker (*Bio-Rad*), il quale definirà le bande corrispondenti ai differenti pesi molecolari. La corsa viene effettuata a 150 V per 45 min. Al termine della corsa, le proteine vengono trasferite dal gel alla membrana di nitrocellulosa 0.2  $\mu$ m (*Bio-Rad*) con il Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (*Bio-Rad*). Dopo il blottaggio, la membrana su cui sono state trasferite le proteine è lasciata basculare per 1 ora in una soluzione al 3% di latte in polvere (*Bio-Rad*) e TBS-Tween (TBS-T); tale processo è importante per la saturazione di tutti i siti aspecifici, così che nella fase di riconoscimento l'anticorpo possa legarsi solo alle proteine.

Avvenuta la saturazione, la membrana è incubata O/N a +4°C con l'anticorpo primario in una soluzione 5% BSA (*Sigma-Aldrich*) e TBS-T; durante questa prima fase di riconoscimento l'anticorpo primario legherà la proteina specifica. Il giorno successivo, la membrana viene lavata con TBS-T per rimuovere l'anticorpo primario che non si è legato e in seguito incubata a TA per 1 ora con un anticorpo secondario coniugato con HRP (*horseradish peroxidase*) (*Cell Signaling*) e diluito 1:10.000 in una soluzione 3% latte e TBS-T. Durante tale fase l'anticorpo secondario si legherà ad una specifica specie di anticorpo primario riconoscendolo.

Il legame proteina-anticorpo viene rilevato utilizzando il Clarity Western ECL Substrate (*Bio-Rad*) e quantificato tramite un'analisi densitometrica con il ChemiDoc Touch™ Imaging System (*Bio-Rad*). Il segnale ottenuto per ogni campione viene normalizzato sulla proteina totale ottenuta dall'acquisizione del gel Stain-free.

Gli anticorpi utilizzati per l'analisi in western blot fanno parte del kit Adipogenesis Marker Antibody Sampler kit: Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), Adiponectin, C/EBP $\alpha$ , FABP4, Fatty Acid Synthase (FAS), Perilipin-1, PPAR $\gamma$  (diluizione 1:5000; *Cell Signaling*).

### 3.8 Saggio ELISA

IL-6 ELISA Kit (*Boster*) permette di valutare la concentrazione di una data proteina, in questo caso l'IL-6, secreta dalle cellule nel medium di coltura.

Il saggio prevede l'utilizzo di una piastra da 96 pozzetti pre-coattata con un anticorpo monoclonale specifico per l'IL-6. Ai pozzetti vengono aggiunti prima i campioni standard e i campioni sperimentali, poi gli anticorpi secondari biotinilati. Dopo una serie di lavaggi con PBS si aggiunge il complesso Avidina Biotina (ABC), e i complessi che non si sono legati sono lavati via con PBS. L'enzima perossidasi (HRP), substrato del N-N Tetrametilbenzidina (TMB), permette di visualizzare la reazione enzimatica a carico di HRP; la catalisi di TMB da parte di HRP determina una colorazione blu dei pozzetti, che vira verso il giallo in seguito all'aggiunta di una soluzione acida di STOP. L'intensità del giallo è direttamente proporzionale al quantitativo di IL-6 presente nel campione e viene quantificata tramite lettura allo spettrofotometro.

I campioni di surnatante utilizzati nel saggio ELISA derivano da cellule 3T3-L1 trattate con citochine per 6 giorni e successivamente sottoposte a stress tramite induzione con Lipopolisaccaride (LPS, 20 ng/mL, *Sigma-Aldrich*) per 24h.

Per l'analisi dell'IL-6 secreta è stato seguito il protocollo indicato dal kit.

### 3.9 Valutazione dello stress ossidativo in *live imaging*

Per valutare una possibile azione anti-ossidante delle citochine è stato utilizzato il colorante CellROX® Orange Reagent (*Thermo Fisher*), il quale permette di misurare i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) localizzati nel citoplasma di cellule vive. Per tale motivo, questa sonda fluorogena è indicativa di una possibile attività anti-ossidante delle citochine in quanto lo stress ossidativo è il risultato di un alterato equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'abilità delle cellule di smaltirlo. Il picco di emissione di fluorescenza è a 565 nm.

Le cellule sono state trattate per 14 giorni con le citochine e successivamente colorate con CellROX® Orange (1:1000) in terreno completo per 30 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione vengono effettuati due lavaggi in PBS per eliminare i residui di colorante; successivamente le cellule vengono trattate con acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 50 µM) per 1h al fine di indurre lo stress ossidativo. Al termine, le cellule vengono visualizzate e fotografate al microscopio a fluorescenza (*Nikon Eclipse Ti2*).

### 3.10 Saggio funzionale di vasculogenesi

L'analisi della formazione di vasi *in vitro* viene effettuata utilizzando un medium semisolido, detto Matrigel (*Corning*). Le HUVEC sono seminate ad una densità di 20.000 cellule/pozzetto in una piastra da 96 pozzetti pre-coattata con Matrigel. Una volta seminate, le cellule vengono trattate con i surnatanti condizionati raccolti dalle ASC mantenute in coltura per 5 giorni in presenza di citochine, e collocate in una camera di incubazione (*On Stage Incubator OKOlabs*) che mantiene controllate le condizioni di CO<sub>2</sub>, temperatura e umidità. Ciò permette di effettuare un'acquisizione in *time lapse* per 24 ore con il microscopio *Nikon Eclipse Ti2*, acquisendo un'immagine ogni 30 minuti, ad ingrandimento 4x, in modo da ottenere una foto dell'intero pozzetto. La misurazione della lunghezza e dei punti di ramificazione dei vasi vengono analizzati con il software NIS-Elements.

### 3.11 Saggio funzionale di *Wound Healing*

Il wound healing è un saggio per la valutazione *in vitro* della migrazione e della proliferazione cellulare. Il saggio prevede di tracciare un solco, detto *scratch*, su un monostrato di cellule.

Le cellule staminali mesenchimali da derma sono seminate in una piastra da 24 pozzetti in terreno completo alla densità di 9000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in coltura fino al raggiungimento della confluenza. Con un puntale da 200 µL viene effettuato uno *scratch* verticale al centro del

pozzetto; a questo punto il medium di coltura viene rimosso e sostituito con i surnatanti condizionati raccolti dalle ASC mantenute per 5 giorni in coltura con le citochine (Fisiologica, IL-4, IL-10).

Subito dopo aver eseguito il taglio, le immagini vengono acquisite utilizzando un microscopio *Nikon Eclipse Ti2*, con ingrandimento 4x, e lo *scratch* viene monitorato continuamente dal T0 a 24 ore, acquisendo una foto ad ogni ora. La misurazione dell'area di *scratch* viene effettuata a 0 e a 24 ore, e la percentuale di chiusura della ferita viene calcolata tramite il software NiS-Element.

### 3.12 Saggio di migrazione cellulare

Le cellule staminali mesenchimali da derma e le cellule staminali adipose vengono seminate alla concentrazione di 25.000 cellule/pozzetto all'interno di inserti transwell da 8  $\mu\text{m}$  (*Thermo Fisher Scientific*) in terreno DMEM-LG completo senza FBS. Gli inserti vengono poi posti in una piastra da 24 pozzetti contenente i surnatanti condizionati raccolti dalle ASC mantenute per 5 giorni in coltura con le citochine (Fisiologica, IL-4, IL-10). Dopo 24 ore dalla semina, il terreno di coltura all'interno dei transwell viene rimosso e le cellule vengono colorate con il NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (1:1000, *Thermo Fisher Scientific*) per 20 minuti a 37°C. Questo colorante si intercala al DNA determinando un'emissione nel blu della fluorescenza.

Al termine della colorazione, le cellule che non sono migrate attraverso la membrana vengono rimosse tramite l'utilizzo di un cotton fioc; le cellule migrate, invece, vengono visualizzate al microscopio a fluorescenza (*Nikon Eclipse Ti2*) e fotografate con un obiettivo 10x. La conta dei nuclei viene eseguita utilizzando il software NiS Element.

### 3.13 Analisi statistica

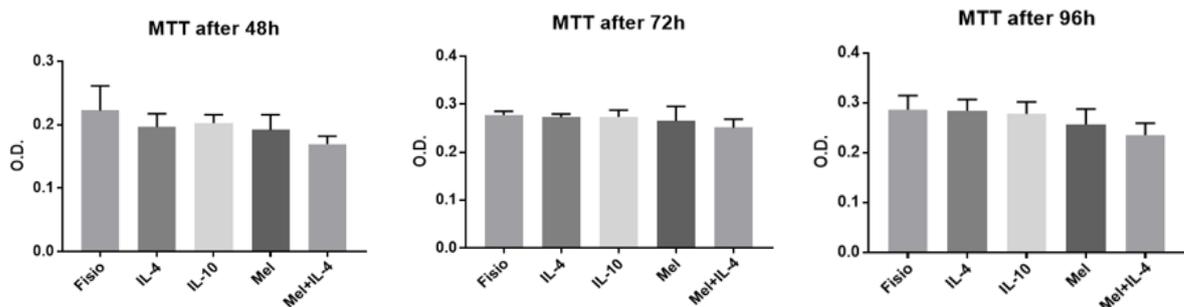
L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato utilizzando il test ANOVA a una via, a seconda del saggio sperimentale. I valori sono stati espressi come media  $\pm$  SD, e i dati sono stati considerati statisticamente significativi quando *p-value* < 0.05.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Effetto delle citochine low-dose sulla vitalità e sul fenotipo cellulare delle 3T3-L1

Per la valutazione degli effetti delle citochine *low dose* sulla crescita delle 3T3-L1, le cellule sono state seminate in una piastra multiwell da 24 pozzetti e mantenute in coltura in terreno completo con somministrazione giornaliera di citochine. Poiché la concentrazione delle citochine utilizzata per i trattamenti risulta estremamente bassa, al fine di evitare la presenza di interferenti, si è deciso di utilizzare il siero dializzato, privo di qualsiasi proteina di origine animale. Inoltre, in tutti gli esperimenti descritti in questa tesi, come controllo è stato sempre utilizzato un campione, denominato “Fisio” a cui viene addizionato pari quantitativo di fisiologica utilizzata negli altri campioni per disciogliere le citochine. Dopo 48h, 72h e 96h di trattamento con IL-4, IL-10, Melatonina e Melatonina+IL-4, ne è stata valutata la vitalità tramite un saggio MTT.

Come si può osservare in Figura 6, nessuna citochina determina cambiamenti significativi dell'assorbanza (O.D.) dell'MTT, indicando che non vi è alcun effetto dei trattamenti sulla sopravvivenza e sulla proliferazione cellulare.

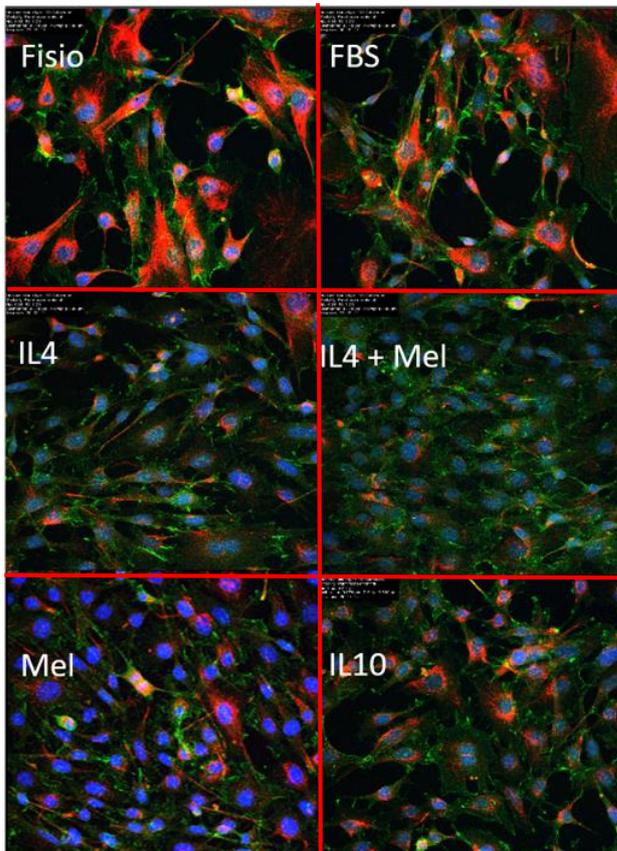


**Figura 6:** Assorbanza rilevata dopo 48, 72, 96 ore di trattamento. Sull'asse delle X sono indicati i trattamenti; con Fisio è indicato il controllo non trattato. Sull'asse delle Y è indicata l'assorbanza rilevata (O.D.). Analisi statistica tramite test One-way ANOVA (n=3)

Per quanto riguarda, invece, il fenotipo cellulare, sono stati analizzati in fluorescenza alcuni *marker* specifici di questo tipo cellulare (Figura 7). Le 3T3-L1 sono state seminate su vetrino posto sul fondo di una piastra multiwell da 24 pozzetti e mantenute in coltura in presenza di citochine fino al giorno 8 (G8).

Alcuni marcatori tipici di queste cellule vengono espressi in maniera diversa tra cellule trattate e non trattate. Nello specifico, la vimentina, una proteina facente parte della famiglia dei filamenti

intermedi, è ampiamente espressa nei controlli, mentre risulta debolmente espressa nelle cellule pre-trattate con citochine.



**Figura 8:** Immunofluorescenza di cellule trattate con citochine per 8 giorni. In rosso la vimentina e in verde la N-caderina. I nuclei sono colorati in blu. I trattamenti sono indicati in ogni immagine. Il controllo è indicato come Fisio, mentre FBS indica la presenza di siero non dializzato. Microfotografie rappresentative di n=3 esperimenti.

La vimentina è coinvolta nel processo di differenziamento adipocitario, dove si ha una delocalizzazione della proteina intorno alle nascenti gocce lipidiche (Brasaemle et al., 2004).

L'espressione della N-caderina, nonostante non mostri differenze quantitative nei vari campioni, sembra essere diversamente organizzata nelle cellule trattate con citochine.

In letteratura è dimostrato che i livelli ematici di caderina cambiano in animali e umani obesi, ristabilendosi solo con la perdita di peso. Inoltre, alcune isoforme della caderina sembrano interferire con il potenziale differenziativo degli adipociti tanto da poter essere considerata un *bio marker* dello stato di salute del tessuto adiposo (Goddeke et al., 2018).

In generale, i dati sulla vitalità cellulare e le immunofluorescenze acquisite indicano che il trattamento con le citochine è assolutamente non nocivo per le cellule, anche se può modificare l'espressione e la distribuzione di alcuni marcatori proteici.

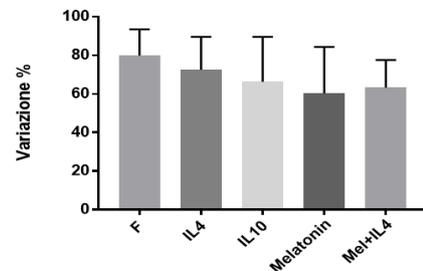
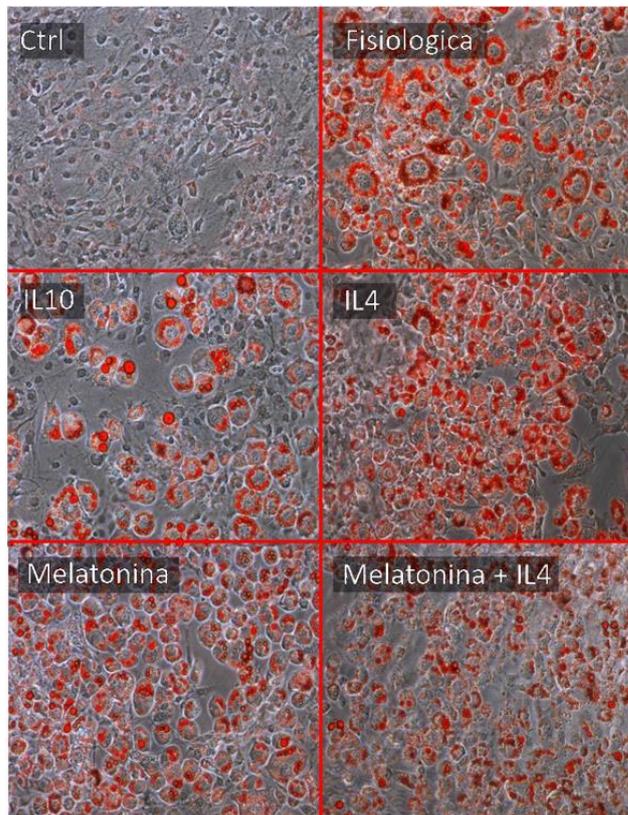
## 4.2 Effetto delle citochine low-dose sul differenziamento adipogenico delle 3T3-L1

Per determinare gli effetti del trattamento con le citochine *low dose* sul differenziamento adipogenico, le cellule sono state indotte a differenziare in adipociti, come descritto in Materiali e Metodi. Il trattamento con le citochine *low dose* è stato mantenuto sia nei giorni precedenti (8 giorni) sia nei giorni successivi al trattamento differenziante.

### 4.2.1 Colorazione con Oil Red O

Dopo 8 giorni di differenziamento adipogenico, le cellule sono state fissate in PFA 4% e colorate con Oil Red O. I campioni sono stati fotografati in campo chiaro dopo di che il colorante incluso nelle cellule è stato solubilizzato per ottenere una quantificazione spettrofotometrica.

Come si può osservare in Figura 9, dalle immagini risulta difficile valutare se ci sia differenza tra trattati e controlli, così come tra i diversi trattamenti. La quantificazione spettrofotometrica sembra invece suggerire, anche se con risultati non statisticamente significativi, che i diversi trattamenti possano ridurre il differenziamento adipogenico.



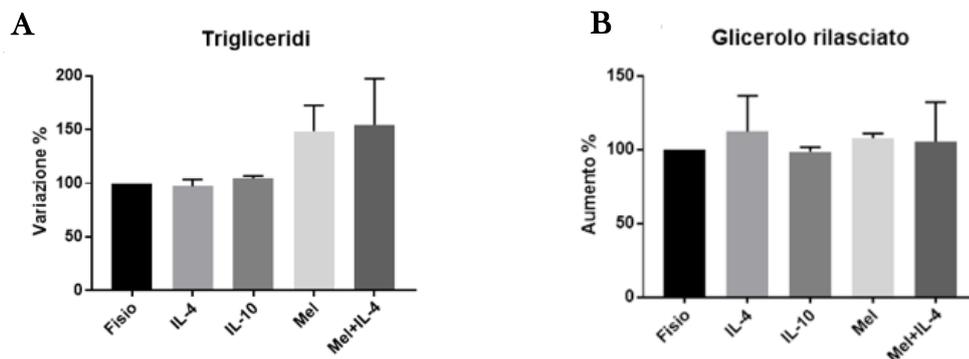
**Figura 9:** Immagini rappresentative dei differenziamenti fotografati al giorno 8 in campo chiaro. Ctrl: controllo negativo; Fisiologica: controllo positivo con fisiologica. A destra il rispettivo grafico di quantificazione: sull'asse delle Y la variazione di assorbanza dell'Oil Red O valutata allo spettrofotometro; sull'asse delle X i trattamenti. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA (n=2).

## 4.2.2 Quantificazione dell'adipogenesi e della lipolisi

Per approfondire gli effetti delle citochine sul differenziamento adipogenico, le 3T3-L1 sono state mantenute in coltura con il terreno di induzione per 6 giorni, come descritto in precedenza, e quindi sottoposte ad ulteriori analisi.

Inaspettatamente, il risultato ottenuto dalla colorazione Oil Red O, che sembrava indicare una riduzione della capacità differenziativa, non è stato confermato dalla quantificazione dei trigliceridi intracellulari, ottenuta mediante saggio colorimetrico. Anche se il contenuto in trigliceridi sembra avere una tendenza all'aumento nelle cellule trattate con Melatonina o con la combinazione Melatonina + IL4 (Figura 10 A), essendo i risultati non significativi, si può confermare che il trattamento con citochine *low dose* non va a modificare in maniera quantitativa il differenziamento di queste cellule.

Poiché nel campo della sindrome metabolica, uno dei principali approcci terapeutici consiste nel stimolare la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi al fine di ridurre i depositi di grasso, è stato valutato l'effetto delle citochine *low dose* in questo ambito. Anche in questo caso, nessuna differenza è stata riscontrata tra i gruppi, indicando che il trattamento con le citochine non sembra modificare la regolazione dei tre principali enzimi (lipasi) coinvolti in questa via metabolica: la trigliceride lipasi del tessuto adiposo (ATGL), la lipasi ormone sensibile (HSL) e la monoacilglicerolipasi (MGL) (Figura 10 B) (Lass et al., 2011).



**Figura 10:** (A) Quantificazione dell'adipogenesi, valutata attraverso la quantificazione dei trigliceridi intracellulari, indicati come variazione rispetto al controllo; Fisio è da considerarsi come controllo positivo (n=2). (B) Lipolisi valutata attraverso la quantificazione della secrezione di glicerolo; Fisio è da considerarsi come controllo positivo. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA (n=2).

### 4.2.3 Western Blot

Per meglio indagare i dati ottenuti sugli effetti che le citochine *low dose* hanno sul differenziamento adipogenico, è stata effettuata un'analisi dell'espressione proteica.

Le cellule 3T3-L1 sono state pre-trattate per 6 giorni con citochine *low dose*, quindi differenziate in adipociti, mantenendo il trattamento giornaliero con le citochine. Le proteine sono state poi raccolte dopo 3 e 6 giorni dall'inizio del differenziamento.

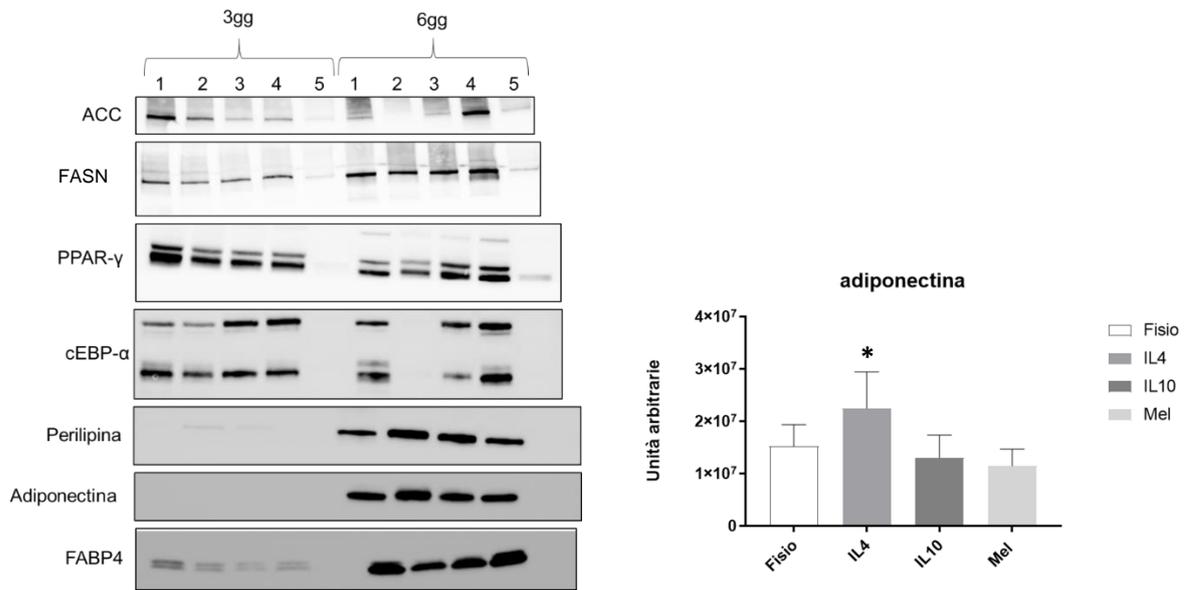
Sono state analizzate le principali proteine coinvolte nella regolazione dell'adipogenesi:

- **FABP4**: chaperone lipidica citoplasmatica che lega gli acidi grassi e i lipidi per il trasporto nelle varie vie cellulari;
- **ADIPONECTINA**: proteina espressa esclusivamente negli adipociti del tessuto adiposo bianco e bruno e secreta nel sangue. Ridotti livelli di questa adipochina sono correlati con condizioni di obesità e insulino-resistenza;
- **PPAR $\gamma$** : attivatore trascrizionale principalmente espresso negli adipociti e nei macrofagi;
- **ACC**: enzima chiave della biosintesi e dell'ossidazione degli acidi grassi;
- **C-EBP $\alpha$** : fattore di trascrizione critico nel processo di differenziamento cellulare e nella risposta infiammatoria. La sua fosforilazione è richiesta nel processo di adipogenesi;
- **PERILIPINA**: proteina localizzata intorno alle gocce lipidiche, rappresenta una protezione nei confronti delle lipasi e gioca un ruolo chiave nello *storage* lipidico;
- **FASN**: proteina che catalizza la sintesi di acidi grassi a lunga catena. Principalmente espressa nel tessuto adiposo, induce la produzione di lipidi nel fegato per l'esportazione di quest'ultimi a tessuti metabolicamente attivi o per lo *storage* nel tessuto adiposo.

Come si può osservare in Figura 11, le proteine dell'adipogenesi risultano essere espresse ma una volta effettuata l'analisi statistica la variabilità all'interno dei gruppi (intragruppo) era troppo alta per poter essere significativo il confronto tra gruppi (intergruppo). L'unica eccezione è l'adiponectina, il cui risultato appare molto interessante.

Il pre-trattamento con citochine appare non essere in grado di arrestare il differenziamento adipogenico, come dimostrato dalle analisi quantitative di Oil Red O, trigliceridi e lipolisi ed espressione proteica, analisi nella quale addirittura la variabilità tra i campioni risulta essere troppo elevata. Questa mancanza di effetto potrebbe essere dovuta al fatto che l'induzione chimica di queste cellule, linea cellulare selezionata appositamente perché prona a questo tipo di differenziamento, è talmente forte da non poter essere arrestata. Risultato interessante è rappresentato da un aumento dell'adiponectina nei trattati con **IL-4**: tale adipochina ha infatti

un'azione anti-infiammatoria e diminuisce all'aggravarsi della condizione di obesità, promuovendo quindi il mantenimento di uno stato infiammatorio.



**Figura 11:** A sinistra le immagini delle membrane con i corrispettivi anticorpi, rappresentative dei campioni analizzati: lane 1 CTRL; lane 2 FISIO; lane 3 IL-4; lane 4 IL-10; lane 5 MELATONINA. A destra l'analisi densitometrica per la valutazione dell'espressione dell'adiponectina a 6 giorni dall'inizio dell'adipogenesi. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA, considerando come controllo interno la FISIO. Significatività indicata con \*, quando  $p < 0.05$ ,  $n=2$ .

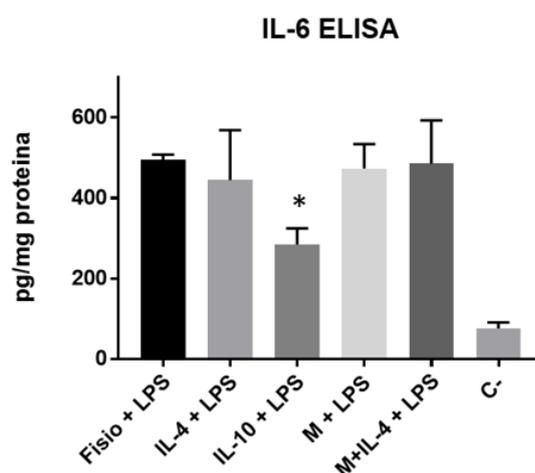
### 4.3 Effetto anti-infiammatorio delle citochine *low-dose* sulle 3T3-L1

A fini preventivi e terapeutici, si è ipotizzato che le citochine *low dose* potessero avere un effetto anti-infiammatorio. Per determinare se ciò fosse vero nel nostro modello cellulare, si è valutata la secrezione di una citochina pro-infiammatoria, IL-6, in seguito a stimolazione con LPS (attivatore generico della risposta infiammatoria) e la modulazione della stessa in seguito a pre-trattamento con citochine *low dose*.

I surnatanti utilizzati per l'analisi sono stati raccolti dopo 6 giorni di pre-trattamento con citochine *low dose* e successiva stimolazione con LPS 20 ng/mL per 24h.

Dal grafico mostrato in Figura 12 è interessante notare come la secrezione di IL-6 sia significativamente ridotta quando le 3T3-L1 sono sottoposte a trattamento con IL-10 *low-dose*.

L'IL-10 risulta quindi essere la più promettente citochina tra quelle testate in un contesto anti-infiammatorio.

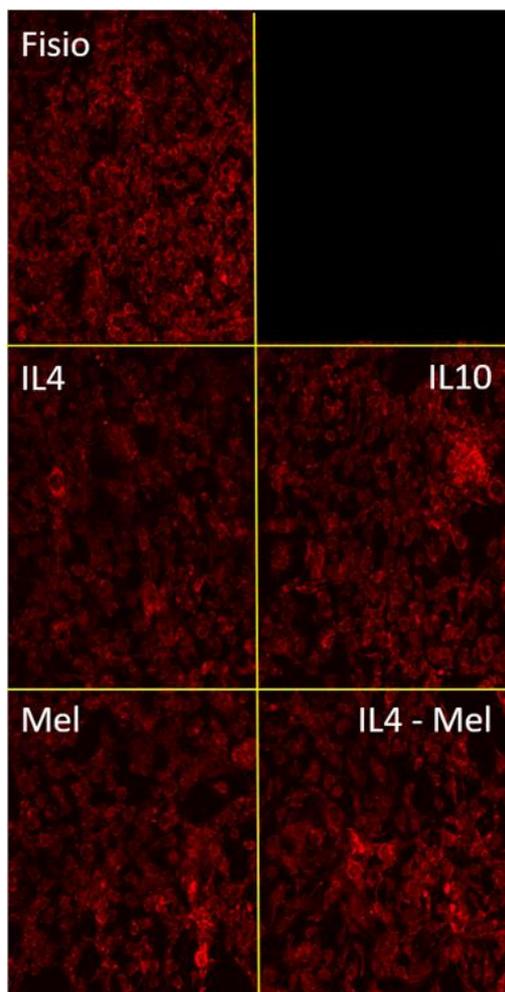


**Figura 12:** Quantificazione della secrezione di IL-6 valutata in ELISA, dopo trattamento con citochine e stimolazione con LPS. C- è il controllo non stimolato con LPS; Fisio è il controllo stimolato con LPS. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA. Significatività indicata con \*, quando  $p < 0.05$ ,  $n=2$ .

### 4.4 Analisi degli effetti protettivi delle citochine *low-dose* sulle 3T3-L1 sottoposte a stress ossidativo

Per la valutazione del potenziale anti-ossidante delle citochine *low-dose*, le cellule 3T3-L1 sono state seminate in una piastra multiwell da 24 pozzetti alla densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> in seguito ad un pre-trattamento con citochine di 14 giorni. Lo stress ossidativo è stato indotto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M per 1 ora e il quantitativo di radicali liberi prodotto è stato valutato con il CellROX<sup>®</sup>. L'utilizzo di questo colorante è funzionale all'analisi dello stress ossidativo in quanto in grado di misurare i ROS localizzati a livello citoplasmatico in cellule vitali.

Le immagini in immunofluorescenza (Figura 13) mostrano una diminuzione dell'intensità di colorazione in corrispondenza di tutti i trattamenti; in particolare l'IL-4 sembra essere la citochina più capace di ridurre i radicali, come si evince dalla colorazione meno intensa rispetto al controllo.



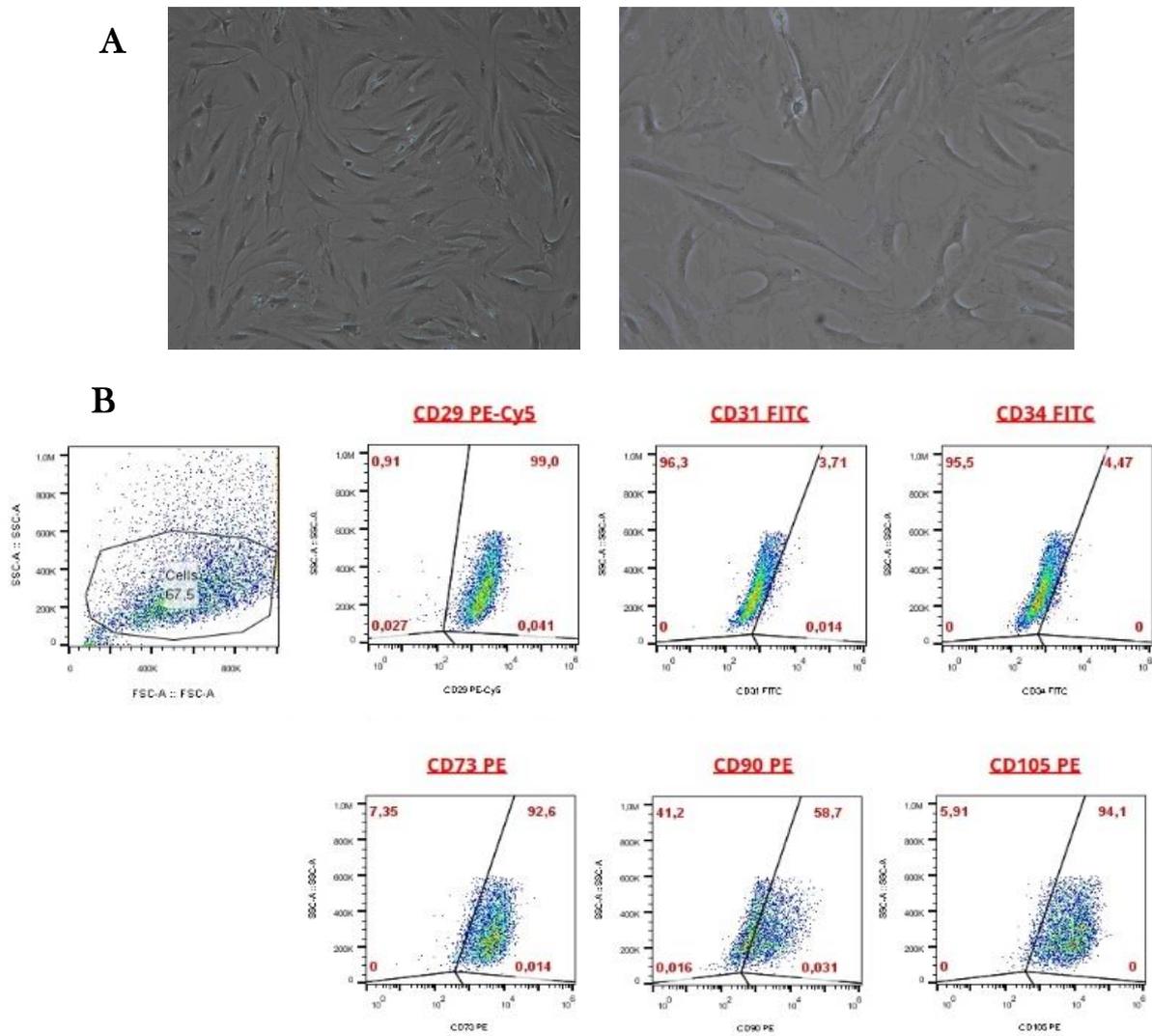
**Figura 13:** immagini in immunofluorescenza di cellule colorate con CellROX® Orange Reagent dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fisio è da intendere come controllo. Le microfotografie mostrate sono rappresentative di n=2 esperimenti.

#### 4.5 Isolamento di cellule staminali adipose

Si è deciso di proseguire la ricerca focalizzandosi anche su un altro tipo cellulare presente nel tessuto adiposo, ossia le ASC. Poiché le ASC rappresentano un regolatore fondamentale del tessuto adiposo, la cui funzionalità appare alterata in pazienti obesi, utilizzando campioni di addominoplastica sottoposti a digestione enzimatica è stato possibile isolare e successivamente ottenere colture di cellule staminali adipose stabilizzate *in vitro*.

Le cellule isolate presentano una morfologia di tipo fibroblastoide, tipica delle cellule staminali mesenchimali. Il fenotipo cellulare è stato confermato dall'analisi citofluorimetrica in cui le

ASC sono risultate positive per il CD105, CD90, CD73 e CD29, e negative per il CD31 e il CD34 (Figura 14).

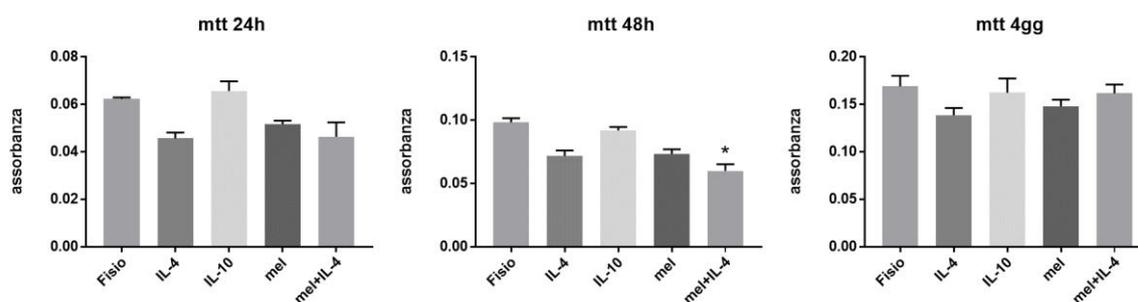


**Figura 14: A)** Immagini di cellule ASC al passaggio 1 fotografate in campo chiaro. A sinistra ASC p1 ingrandimento 10x; a destra ASC p1 ingrandimento 20x. **B)** Caratterizzazione citofluorimetrica di ASC al passaggio 3, rappresentativa dei campioni analizzati

## 4.6 Studio degli effetti delle citochine *low dose* sulla vitalità cellulare delle ASC

Al fine di valutare gli effetti del trattamento con citochine *low dose* su una coltura cellulare di ASC è stato effettuato un saggio MTT. Le cellule sono state seminate alla densità di 3000 cellule/cm<sup>2</sup> su una piastra da 24 pozzetti e mantenute in coltura in terreno completo con somministrazione giornaliera di citochine. L'analisi della vitalità è stata effettuata dopo 24 ore, 48 ore e 4 giorni dalla semina.

Come possiamo osservare in Figura 15, nessuna citochina ha un effetto negativo sulla sopravvivenza cellulare, anche se pare nei primi giorni rallentare la proliferazione, in particolare a 48 ore nei campioni trattati con la combinazione di citochine: l'assorbanza difatti risulta aumentata per tutti i campioni rispetto al giorno precedente, dato che dimostra che le cellule sono più numerose col passare del tempo.



**Figura 15:** Assorbanza rilevata dopo 24h, 48h e 4 giorni di trattamento. Sull'asse delle X sono indicati i trattamenti; con Fisio è indicato il controllo non trattato. Sull'asse delle Y è indicata l'assorbanza rilevata (O.D.). Analisi statistica tramite test One-way ANOVA. Significatività indicata con \*, quando  $p < 0.05$  ( $n=3$ ).

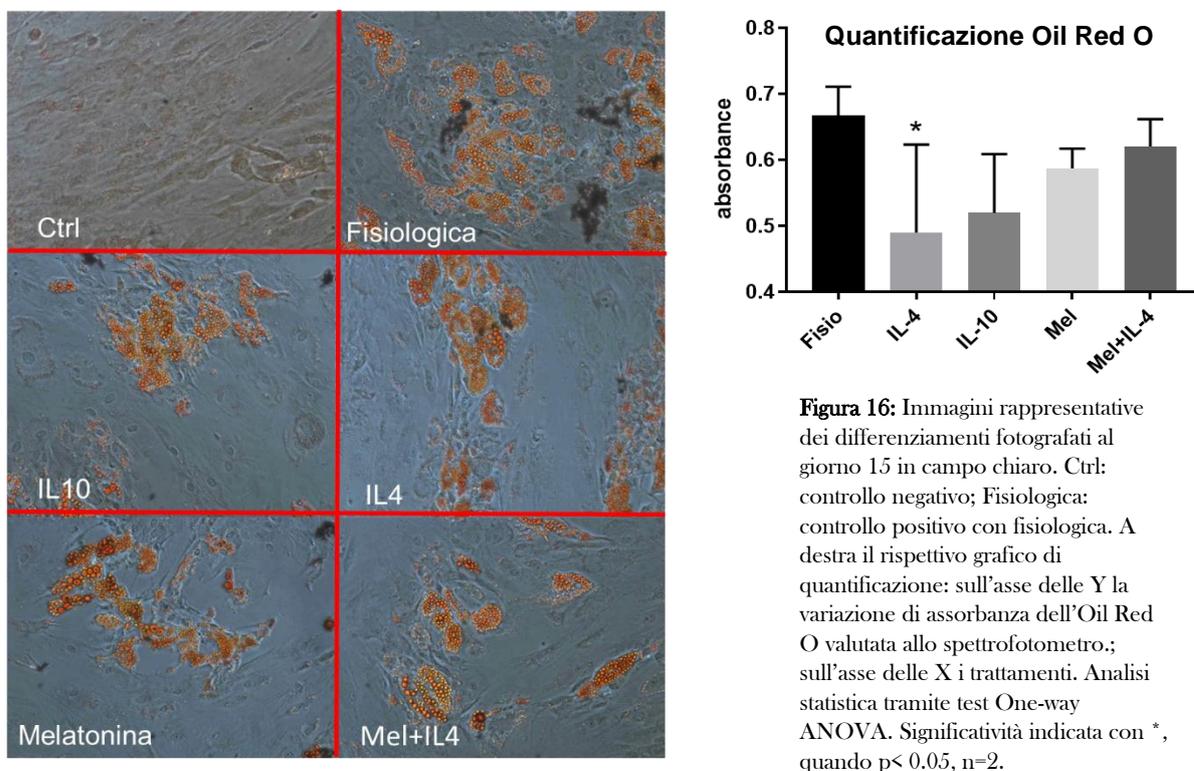
## 4.7 Effetto delle citochine *low dose* sul differenziamento adipogenico delle ASC

Per determinare gli effetti del trattamento con le citochine *low dose* sul differenziamento adipogenico, le cellule sono state indotte a differenziare in adipociti come descritto in Materiali e Metodi. Il trattamento con le citochine *low dose* è stato mantenuto sia nei giorni precedenti (8 giorni) sia nei giorni successivi al trattamento differenziante.

### 4.7.1 Colorazione con Oil Red O

Dopo 8 giorni di pre-trattamento con le citochine *low dose*, le cellule sono state seminate in una piastra da 48 pozzetti alla densità di 9000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in terreno completo con FBS dializzato, con aggiunta giornaliera di citochine. Due giorni dopo la semina le cellule sono

state trattate con il terreno di differenziamento per 15 giorni e successivamente colorate con l'Oil Red O. Al fine di avere non solo un'analisi qualitativa, ma anche quantitativa, il colorante è stato solubilizzato e quantificato allo spettrofotometro.



In Figura 16 si può osservare come il trattamento con citochine *low dose* determini una riduzione del differenziamento adipogenico, soprattutto per quanto riguarda l'IL-4, il cui dato è significativamente rilevante, e l'IL-10.

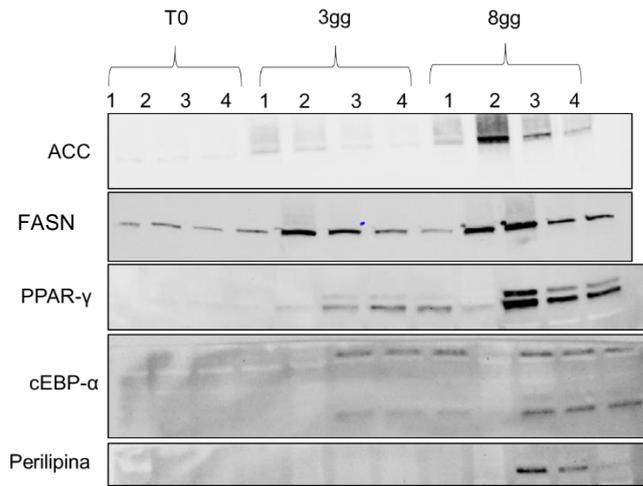
Osservando i dati raccolti sia sulle 3T3-L1 sia sulle ASC appare evidente come l'IL-4 *low dose* e l'IL-10 *low dose* siano le citochine più promettenti, in quanto in grado di modificare in maniera significativa vari aspetti del metabolismo cellulare in entrambe le popolazioni. Per tale motivo si è deciso di proseguire lo studio solo con queste due, eliminando quindi la condizione di trattamento con la Melatonina.

#### 4.7.2 Western Blot

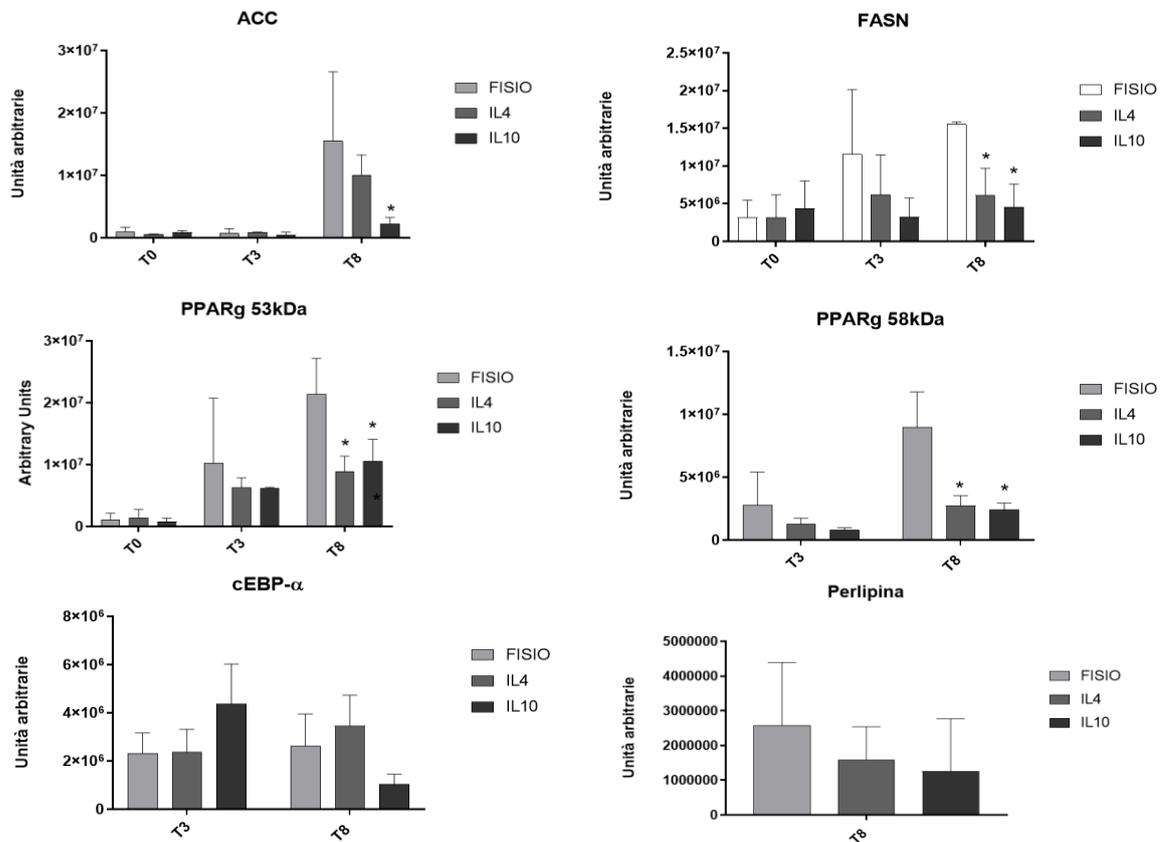
Per confermare i dati ottenuti sugli effetti che le citochine *low dose* sembrano avere sul differenziamento adipogenico, è stata effettuata un'analisi sull'espressione proteica.

Le cellule ASC sono state pre-trattate per 8 giorni con citochine *low dose*, quindi differenziate in adipociti, mantenendo il trattamento giornaliero con le citochine (IL-4 e IL-10). Le proteine sono state poi raccolte dopo 3 e 10 giorni dall'inizio del differenziamento.

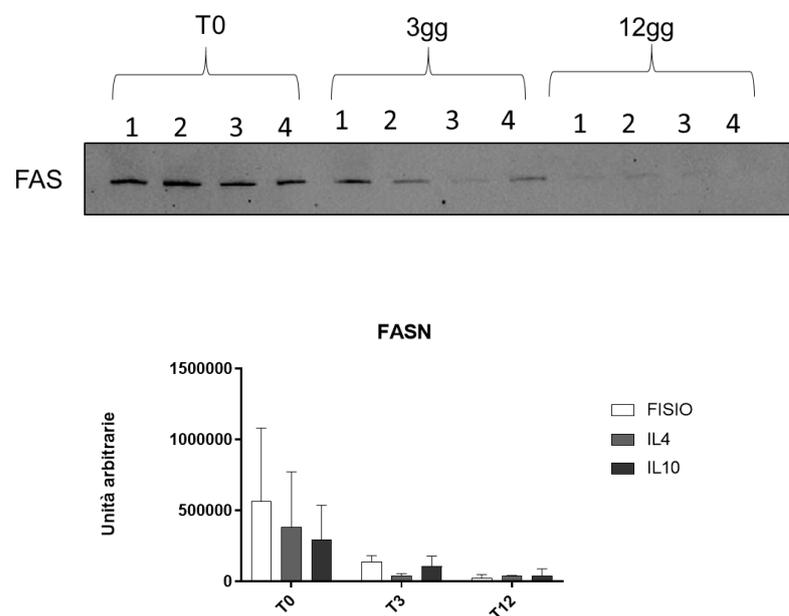
Come si può osservare in Figura 17, di particolare interesse si è dimostrata la risposta al pre-trattamento con IL-4 e IL-10, in quanto tutte le proteine coinvolte nella *pathway* di differenziamento risultano modulate, in particolare le citochine sembrano down-regolare l'espressione proteica.



**Figura 17:** Western blot rappresentativo dei campioni analizzati. Lane 1 CTRL; lane 2 FISIO; lane 3 IL-4; lane 4 IL-10. In basso le analisi densitometriche per la valutazione dell'espressione delle proteine dell'adipogenesi. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA, considerando come controllo interno la FISIO. Significatività indicata con \*, quando  $p < 0.05$ ,  $n=3$ .



Ripetendo l'esperimento su due nuovi campioni di ASC isolate da pazienti gravemente obesi, il risultato ottenuto è stato completamente diverso: una mancata espressione di tutte le proteine adipogeniche fatta eccezione per FASN. La spiegazione di questo risultato è probabilmente da andare a ricercare sulla diversa fonte delle cellule ASC: negli esperimenti precedenti i pazienti da cui provenivano le cellule si trovavano in una situazione clinica di lieve sovrappeso, e quindi in uno stadio della patologia definito *early*, in cui le ASC preservano ancora un potenziale differenziativo attivo, mentre le cellule di questi ultimi campioni derivavano da pazienti con una condizione di obesità conclamata (stadio *late*), in cui le cellule potrebbero aver completamente perso la loro capacità di differenziare (Figura 18).



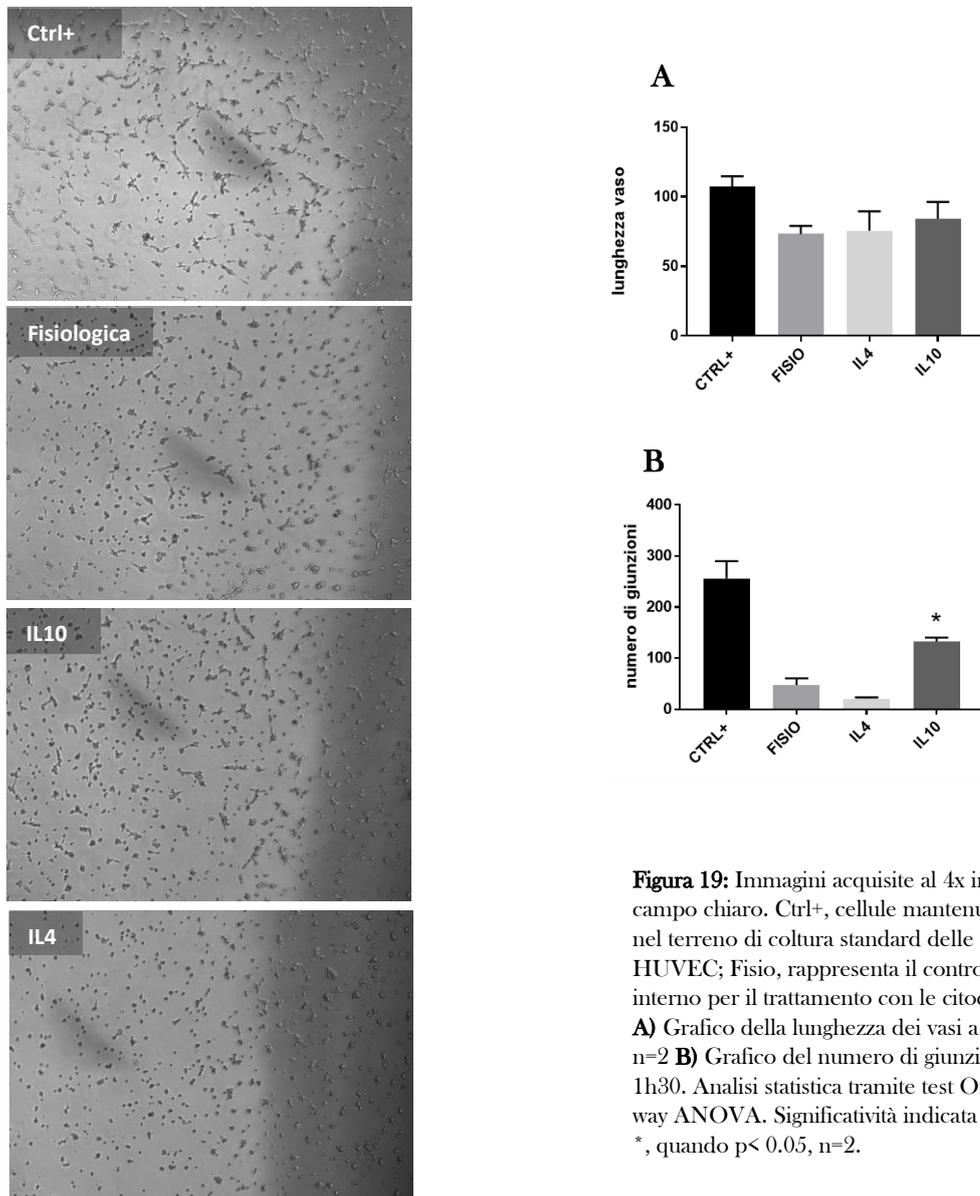
**Figura 18:** Western rappresentativi dei campioni analizzati: lane 1 CTRL; lane 2 FISIO; lane 3 IL-4; lane 4 IL-10. In basso le analisi densitometriche per la valutazione dell'espressione delle proteine dell'adipogenesi. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA, considerando come controllo interno la FISIO (n=2).

## 4.8 Effetti del trattamento con citochine *low dose* su angiogenesi, migrazione e rigenerazione cellulare

### 4.8.1 Saggio di vasculogenesi

Nell'ambito della sindrome metabolica, lo stato infiammatorio che si instaura determina una minore capacità pro-angiogenica delle ASC contribuendo all'instaurarsi di una situazione di ipossia e di morte degli adipociti (Louwen et al., 2018).

Per valutare se il trattamento con le citochine *low dose* avesse un effetto su questo aspetto, è stato effettuato un saggio di vasculogenesi *in vitro* utilizzando come modello cellulare le HUVEC, mantenute in coltura con i surnatanti delle ASC raccolti dopo 6 giorni di trattamento con le citochine.



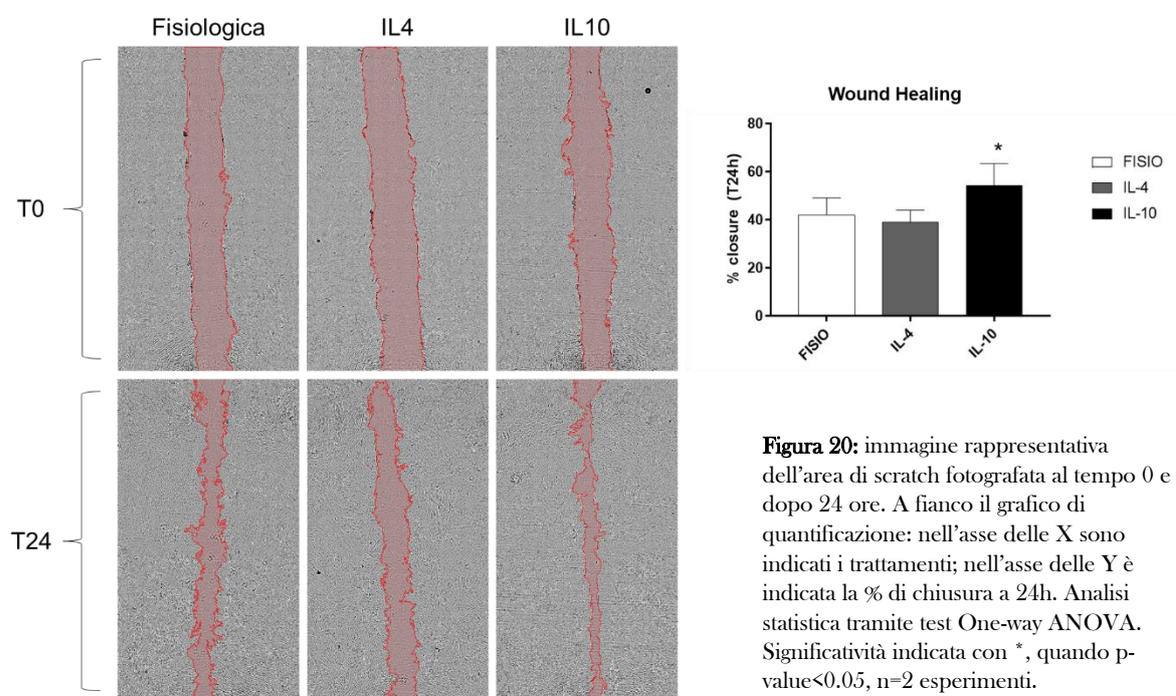
**Figura 19:** Immagini acquisite al 4x in campo chiaro. Ctrl+, cellule mantenute nel terreno di coltura standard delle HUVEC; Fisi, rappresenta il controllo interno per il trattamento con le citochine. **A)** Grafico della lunghezza dei vasi a 1h30, n=2 **B)** Grafico del numero di giunzioni a 1h30. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA. Significatività indicata con \*, quando  $p < 0.05$ , n=2.

Come possiamo vedere in Figura 19, dopo 1.30 h dall'inizio del saggio, l'analisi della lunghezza media dei vasi non ha mostrato differenze tra i vari trattamenti; lo stesso non si può dire se si considerano il numero delle connessioni, in quanto in questo caso si osserva un effetto nettamente maggiore dell'IL-10 *low dose*. Questo risultato suggerisce che in presenza di IL-10 le ASC siano stimulate a rilasciare più fattori pro-angiogenici rispetto alla condizione basale.

#### 4.8.2 Saggio di *wound healing*

Il saggio di *wound healing* è stato effettuato utilizzando come modello cellulare le MSC da derma, le quali sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti e mantenute in coltura fino al raggiungimento della confluenza. Successivamente è stato effettuato uno *scratch* al fine di mimare la ferita, il terreno di coltura è stato rimosso e sostituito con i surnatanti delle ASC, raccolti dopo 5 giorni di trattamento con citochine *low dose*. Le analisi di chiusura della ferita sono state effettuate al tempo 0 e a 24 ore.

I risultati ottenuti (Figura 20) indicano che vi è una maggiore chiusura della ferita nelle cellule trattate con i surnatanti condizionati con IL-10 *low dose*, dato per altro statisticamente significativo. Ciò risulta molto interessante in quanto nella sindrome metabolica lo stato infiammatorio cronico che si instaura comporta una minore capacità rigenerativa e quindi una maggiore possibilità di recidive (Swezey, 2015).

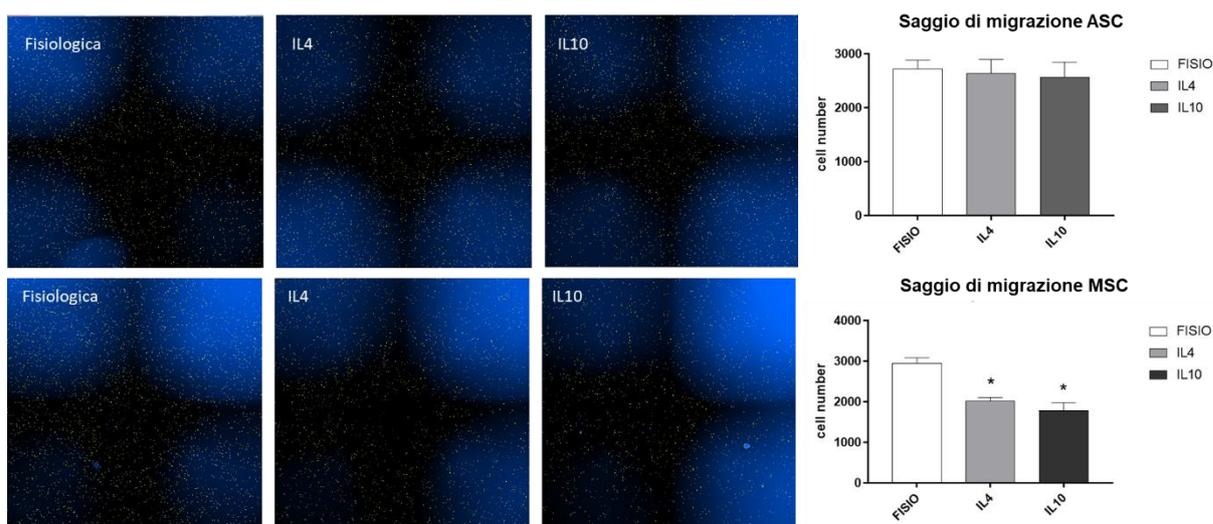


**Figura 20:** immagine rappresentativa dell'area di scratch fotografata al tempo 0 e dopo 24 ore. A fianco il grafico di quantificazione: nell'asse delle X sono indicati i trattamenti; nell'asse delle Y è indicata la % di chiusura a 24h. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA. Significatività indicata con \*, quando p-value<0.05, n=2 esperimenti.

### 4.8.3 Saggio di migrazione cellulare

Sia le ASC sia le MSC sono in grado di migrare nell'area di danno e generalmente questa capacità è indotta da citochine e fattori di crescita. In condizioni di obesità tale capacità risulta essere alterata, nello specifico ASC isolate da pazienti obesi mostrano un'abilità migratoria e quindi di invasione maggiore, comportando quindi il rischio di sviluppo di tumori in altre sedi corporee come la prostata (Louwen et al., 2018).

Per approfondire questo aspetto è stato effettuato un saggio di migrazione cellulare con inserti *transwell*. Le MSC da derma e le ASC sono state seminate in terreno completo all'interno dei *transwell*, i quali sono poi stati posti in una piastra da 24 pozzetti contenente surnatanti condizionati raccolti dalle ASC mantenute per 5 giorni in coltura con le citochine. Dopo 24 ore le cellule vengono colorate con NucBlue Live, quelle che non sono migrate, presenti nella parte superiore del *transwell*, vengono rimosse, mentre le altre sono state visualizzate al microscopio e contate.



**Figura 21: A)** immagini in immunofluorescenza di cellule ASC colorate con NucBlue Live ReadyProbes Reagent, rappresentative degli esperimenti. Fisiologica è da intendere come controllo. Le foto acquisite sono rappresentative di n=2 esperimenti. A destra il rispettivo grafico di quantificazione: sull'asse delle Y il numero di cellule totali; sull'asse delle X i trattamenti (n=2). **B)** immagini in immunofluorescenza di cellule MSC colorate con NucBlue Live ReadyProbes Reagent. Fisiologica è da intendere come controllo. Le foto acquisite sono rappresentative di n=2 esperimenti. A destra il rispettivo grafico di quantificazione: sull'asse delle Y il numero di cellule totali; sull'asse delle X i trattamenti. Analisi statistica tramite test One-way ANOVA. Significatività indicata con \*, quando  $p < 0.05$ , n=2.

In Figura 21 si può osservare che la capacità migratoria delle ASC in seguito al trattamento con i surnatanti condizionati risulta rimanere invariata; lo stesso non si può dire per le MSC, in cui il numero di cellule migrate è nettamente inferiore in presenza di surnatanti condizionati con IL-4 *low dose* e IL-10 *low dose*.

Questo risultato suggerisce come il pre-trattamento delle ASC con citochine *low dose* promuova un minor stato infiammatorio che si traduce in una minore produzione di citochine pro-infiammatorie e quindi in una ridotta mobilitazione delle MSC. Allo stesso tempo l'azione del surnatante raccolto dalle ASC sulle ASC stesse non ha alcun effetto, ipotizziamo perché tali cellule, isolate da pazienti già in sovrappeso, si trovano in una situazione troppo compromessa, a causa della quale hanno perso la loro capacità di rispondere in maniera adeguata agli stimoli che regolano la loro mobilitazione.

## 5. DISCUSSIONE

La sindrome metabolica è una patologia caratterizzata da più fattori, tra i quali i principali sono l'ipertensione, l'insulino-resistenza, l'obesità, l'ipertrigliceridemia, una riduzione del colesterolo HDL concomitante a un aumento del colesterolo LDL e microalbuminuria. E' evidente quindi come vi sia una stretta correlazione tra la sindrome metabolica e le malattie cardiovascolari, in quanto la sindrome stessa costituisce un *cluster* di fattori di rischio per tali patologie.

Nonostante che l'insulino-resistenza e l'obesità rappresentino i fattori chiave nello sviluppo della sindrome metabolica, la letteratura evidenzia che il principale *player* di tale patologia e delle conseguenze che essa comporta sia un'inflammatione cronica di basso grado (*Chronic Low Grade Inflammation*), la quale non risulta associata ad un'infezione o ad una risposta auto-immunitaria, ma è correlata principalmente ad un eccessivo aumento del tessuto adiposo addominale.

Sulla base di queste considerazioni, lo scopo del progetto di ricerca è stato quello di testare citochine a basso dosaggio nell'ambito di questa patologia, come possibile cura dell'inflammatione cronica. I trattamenti medici ad oggi utilizzati prevedono l'utilizzo di farmaci diretti verso un singolo fattore di rischio a valle della sindrome, come possono essere le statine per la dislipidemia, oppure vengono usate strategie terapeutiche che utilizzano molecole reattive ad azione anti-inflammatoria. Il razionale di queste ultime è sicuramente corretto, ma essendo i farmaci impiegati ad alti dosaggi, il loro utilizzo non può essere prolungato, ossia cronico, a causa dei numerosi effetti collaterali, come ad esempio nel caso dell'infliximab, molto utilizzato nel trattamento dell'artrite reumatoide, ma particolarmente dannoso per altre malattie autoimmuni come la sclerosi multipla.

Bisogna poi considerare che la maggior parte degli studi *in vitro* utilizza alte concentrazioni di molecole, siano esse citochine, molecole di sintesi o naturali, per 24-48 ore, e quasi mai per trattamenti estesi nel tempo, al contrario di ciò che avviene fisiologicamente, dove invece sono presenti in concentrazione inferiore per ordine di grandezza, ma in maniera costante. Per questo motivo, in accordo con l'azienda GUNA, si è deciso di pre-trattare le cellule utilizzate in questa tesi con concentrazioni *low dose* per un tempo prolungato e di mantenere il trattamento per tutta la durata sperimentale. Poiché l'inflammatione cronica a basso grado inizia in seguito ad un aumento eccessivo del tessuto adiposo, nella prima parte di questa ricerca si è valutato l'effetto di bassi dosaggi di citochine anti-inflammatorie su una linea di pre-adipociti murini (3T3-L1). Le citochine utilizzate sono state fornite dall'azienda GUNA S.p.a., tutte attivate

secondo la metodica SKA, descritta nell'introduzione: GUNA®-Interleukin 4 (IL-4), GUNA®-Interleukin 10 (IL-10), GUNA®-Melatonin, GUNA®-Melatonin + GUNA®-IL-4.

Come discusso nei risultati, a queste concentrazioni le citochine non vanno ad alterare la vitalità cellulare delle 3T3-L1, ma hanno comunque un effetto sul fenotipo cellulare, andando a modificare l'espressione e la localizzazione di due *marker* quali la vimentina e la N-caderina. La vimentina è ampiamente espressa nei controlli, al contrario dei trattati con le citochine in cui la sua espressione si abbassa notevolmente. Questo risultato appare molto interessante in quanto tale proteina è una componente del citoscheletro coinvolta nel processo di differenziamento adipocitario. Per quanto riguarda la N-caderina, questa appare diversamente organizzata nelle cellule trattate con le citochine; tale riorganizzazione potrebbe essere correlato al fatto che, come la vimentina, anche alcune isoforme della caderina interferiscono con il potenziale differenziativo degli adipociti.

Si è quindi proceduto ad indagare l'effetto di queste citochine sul differenziamento adipogenico e su marcatori connessi a questo differenziamento; ciò che si è osservato è una tendenza inibitoria da parte delle citochine *low dose*, anche se nessun dato è statisticamente significativo. Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione proteica nemmeno qui si è riusciti ad ottenere significatività statistica, in quanto la variabilità tra i campioni era troppo alta. I dati ottenuti, sembrano indicare un blando effetto da parte delle citochine *low dose*, ma, probabilmente a causa della natura delle 3T3-L1, ossia una linea cellulare pre-adipocitaria già prona a questo tipo di differenziamento, l'induzione chimica a cui sono sottoposte per simulare il differenziamento *in vitro* è talmente forte da non poter essere arrestata. Nonostante ciò, il fatto che l'adiponectina aumenti la sua espressione nei campioni trattati con IL-4 rappresenta un risultato positivo, in quanto la produzione di tale adipochina risulta estremamente ridotta in pazienti obesi e ciò normalmente è una concausa dello stato infiammatorio associato alla sindrome metabolica, in quanto essa stessa rappresenta una citochina anti-infiammatoria.

Le citochine *low dose*, in conclusione, non sembrano avere effetto sul differenziamento adipocitario in questo tipo di cellule e si è quindi proceduto a valutare la loro capacità di indurre altri effetti benefici. Come è già stato detto, l'infiammazione cronica rappresenta la causa primaria della sindrome metabolica e tale infiammazione ha come sede di inizio il tessuto adiposo; si è deciso di valutare come ultima analisi l'azione anti-infiammatoria delle citochine *low dose* su cellule 3T3-L1 trattate con LPS, valutando la secrezione di IL-6, citochina pro-infiammatoria per eccellenza. In particolare, IL-10 si è dimostrata in grado di ridurre notevolmente la secrezione di IL-6, mediando quindi un possibile effetto anti-infiammatorio.

E' noto che, in condizioni di obesità, all'aumentare del tessuto adiposo aumenta anche la richiesta nutritiva del tessuto stesso, che può essere sopperita solo attraverso la produzione di nuovi vasi sanguigni. Nonostante ciò, l'aumentata densità capillare non riesce a compensare la crescita eccessiva del tessuto, il che comporta un'insufficienza vascolare, una situazione di ipossia che conduce allo stress ossidativo. Per tale motivo, si è proceduto ad indagare un possibile effetto anti-ossidante delle citochine *low dose*, mimando una situazione di stress ossidativo tramite trattamento delle cellule con  $H_2O_2$ . Come è possibile vedere dalle immagini di immunofluorescenza, si osserva un'azione anti-ossidante di tutte le citochine, anche se quella con l'effetto protettivo maggiore sembra sempre essere l'IL-4.

In conclusione, questa prima parte dello studio ha messo in luce come le citochine a basso dosaggio non vadano in alcun modo a modificare la vitalità cellulare, nonostante abbiano un effetto sul fenotipo cellulare, modificando l'espressione e la localizzazione della vimentina e della E-caderina. Lo studio degli effetti delle citochine *low dose* sul differenziamento adipogenico ha messo in evidenza che IL-4 e IL-10 sembrano avere una parziale capacità inibitoria sull'adipogenesi, che però non risulta essere significativa in quanto i risultati ottenuti dai vari saggi sperimentali sono molto variabili, ad eccezione dell'espressione dell'adiponectina che appare aumentata, risultato estremamente positivo in quanto tale adipochina è una citochina anti-infiammatoria. In ultimo le cellule trattate con citochine a basso dosaggio hanno mostrato una diminuzione del contenuto di ROS (in particolare con IL-4) quando sottoposte a stress con  $H_2O_2$  e un'attivazione ridotta quando stimolate con LPS (pre-trattamento con IL-10), diminuendo la secrezione di citochine pro-infiammatorie, quali IL-6.

Accanto alle cellule del sistema immunitario e agli adipociti, nel tessuto adiposo vi è un'altra popolazione cellulare estremamente importante, le cellule staminali adipose (ASC), le quali rappresentano un regolatore fondamentale di tale tessuto e le cui funzionalità sono estremamente alterate nella sindrome metabolica. Proprio per questo motivo, le ASC sono state le protagoniste della seconda parte di questo studio. Anche in questo caso, in prima battuta, è stata valutata la vitalità cellulare delle ASC in presenza di citochine *low dose*. Si è osservato che, anche per queste cellule, i trattamenti non risultano essere tossici, anche se la combinazione IL-4 e Melatonina sembra rallentare nelle prime 48 ore in modo significativo la proliferazione. Poiché le cellule non mostravano sofferenza, si è proceduto con le analisi successive.

Negli stadi precoci dell'obesità, a livello del tessuto adiposo si osserva un aumento della proliferazione e del differenziamento in senso adipogenico delle cellule staminali adipose, con

conseguente iperplasia e ipertrofia degli adipociti, al fine di compensare l'elevata assunzione di nutrienti. Per tale motivo si è voluta valutare l'azione delle citochine *low dose* sul differenziamento adipogenico delle ASC: i risultati ottenuti sono stati molto promettenti in quanto sia dall'analisi della colorazione con Oil Red O sia dall'analisi proteica si è osservato un effetto inibitorio da parte delle citochine, nello specifico IL-4 e IL-10, confermando quindi in maniera più delineata i risultati ottenuti con le 3T3-L1. I risultati si sono ripetuti su tre popolazioni cellulari isolate da pazienti diversi, tutti in condizioni di sovrappeso moderato. Per quanto concerne l'espressione proteica, il trattamento con IL-4 e IL-10 determina una riduzione dell'espressione di tutte le proteine coinvolte nell'adipogenesi. Nello specifico sia IL-4 sia IL-10 riducono in maniera significativa l'espressione di FASN e PPAR- $\gamma$  al giorno 8 dall'inizio dell'induzione dell'adipogenesi. Questo risultato appare molto interessante in quanto PPAR- $\gamma$  è il regolatore chiave dell'adipogenesi e FASN è responsabile dello *storage* dei lipidi nel tessuto adiposo. L'espressione di quest'ultimo enzima è strettamente dipendente dalle condizioni nutrizionali del tessuto: FASN catalizza la biosintesi degli acidi grassi nel fegato e nel tessuto adiposo ed è particolarmente attivato in seguito ad una dieta ad alto contenuto di carboidrati, mentre la sua presenza si riduce in seguito ad una dieta povera di acidi grassi (Mayas et al., 2010).

Interessanti sono i risultati che si sono ottenuti su cellule isolate da pazienti obesi conclamati. Puntando l'attenzione sull'analisi proteica piuttosto che sulla colorazione e quantificazione dell'ORO, ci si è trovati davanti ad un pannello di espressione completamente diversa. Infatti solo FASN è stata rilevata, mentre le altre proteine sono risultate non espresse in maniera quantificabile, e la sua espressione si riduce all'aumentare dei giorni di differenziamento, indipendentemente dal trattamento con le citochine. Questo risultato è concorde con il fatto che, come riportato in letteratura (Louwen et al., 2018), il processo adipogenico delle ASC nell'ambito della sindrome metabolica è dinamico, e quindi nel primo set i pazienti erano ancora in uno stadio precoce (*early*) della sindrome, in cui le cellule avevano un potenziale differenziativo attivo, mentre nel secondo caso, che si potrebbe definire stadio tardivo (*late*), nei campioni analizzati le ASC hanno un potenziale differenziativo alterato, che va a modificare tutta l'espressione proteica.

In condizioni di obesità, un altro aspetto molto importante correlato con l'instaurarsi del processo infiammatorio è l'incapacità delle ASC di promuovere angiogenesi tramite la riduzione della secrezione di fattori pro-angiogenici come VEGF, HGF, FGF e PDGF. Ciò concorre all'instaurarsi di una condizione di ipossia con conseguente morte degli adipociti e stress cellulare. Tramite un saggio *in vitro* di vasculogenesi si è andati a valutare se i surnatanti

raccolti da ASC pre-trattate con citochine *low dose* avessero un effetto sulla formazione di vasi a partire da cellule endoteliali da cordone ombelicale. Anche se non si è di fronte a risultati eclatanti, si può comunque notare come ci sia una tendenza ad aumentare la capacità di vasculogenesi da parte dell'IL-10 quando si vanno a considerare il numero di giunzioni che le cellule endoteliali creano durante il saggio. Ciò implica che le ASC in presenza di questa citochina siano stimulate probabilmente a rilasciare più fattori pro-angiogenici.

Una condizione di ridotta vascolarizzazione comporta anche un ritardo nel processo di rigenerazione tissutale portando quindi alla necrosi del tessuto (Swezey, 2015). Tramite un saggio di *wound healing* è stato valutato l'effetto del trattamento con le citochine *low dose* sulla rigenerazione tissutale: nello specifico sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali da derma, in quanto rappresentano un modello cellulare particolarmente indicato per questo tipo di saggio, trattate con surnatanti raccolti da ASC pre-trattate con citochine *low dose*. Si è osservata una maggior chiusura della ferita nei campioni trattati con IL-10 *low dose*, che sembra indurre il rilascio da parte delle ASC di fattori chemiotattici che migliorano il processo di rigenerazione tissutale.

E' stato dimostrato che le ASC da pazienti obesi, oltre a mostrare un ridotto potenziale angiogenico, hanno anche un'abilità di migrazione e di invasione della matrice extracellulare estremamente alterata (Perez et al., 2016). Nello specifico le ASC isolate dal tessuto adiposo sottocutaneo di pazienti obesi in stadio precoce della malattia hanno un'aumentata capacità di invasione associata all'espressione di calpaina-4, calpastatina e MMP-15, che si traduce in un aumento del numero di tali cellule circolanti e quindi ad una maggiore probabilità di sviluppare tumori; al contrario le ASC isolate da pazienti obesi in uno stadio più avanzato non sono più in grado di rispondere agli stimoli che regolano la loro motilità (Louwen et al., 2018). La capacità migratoria delle ASC in seguito al trattamento con i surnatanti condizionati risulta essere inalterata, ma lo stesso non si può dire delle MSC. Infatti, per queste ultime si osserva una riduzione significativa dell'attività migratoria in seguito al trattamento con surnatanti condizionati con IL-4 e IL-10 *low dose*. Questo risultato indica che il pre-trattamento delle ASC con citochine *low dose* induce un minor stato infiammatorio che si traduce in una minore produzione di citochine pro-infiammatorie nel surnatante e quindi in una ridotta mobilitazione delle MSC. Allo stesso tempo l'azione del surnatante raccolto dalle ASC sulle ASC stesse non ha alcun effetto. Questo dato è molto interessante e richiederebbe ulteriori analisi. Tra le ipotesi ci potrebbe essere quella della compromissione della capacità migratoria, che potrebbe essere causata da diversi fattori: un ambiente normossico di coltura che non favorisce la migrazione delle ASC, abituate a stare in un ambiente ipossico, una diversa capacità di queste

cellule nel rispondere a stimoli di questo tipo, o una diminuita responsività dovuta alla situazione clinica del paziente da cui sono state isolate, che ne ha compromesso tale abilità.

Quindi, i risultati ottenuti fino ad ora dal trattamento delle ASC con citochine *low dose*, nello specifico IL-4 e IL-10, sono stati molto incoraggianti. Infatti non solo si è osservato che il trattamento con le citochine non risulta essere tossico, anche se talvolta sembra rallentare la crescita cellulare, ma determina un'inibizione del processo adipogenico. Inoltre il trattamento con IL-10 sembra stimolare le ASC a produrre fattori che inducono una maggiore vasculogenesi; non solo, IL-10 induce le ASC a produrre fattori chemiotattici che determinano una maggiore capacità di rigenerazione tissutale da parte delle MSC da derma. Infine, il trattamento con IL-4 e IL-10 stimola probabilmente una minore produzione di citochine pro-infiammatorie, che inducono in maniera significativa una minore mobilità di cellule MSC.

In conclusione, questi risultati aprono una buona prospettiva per un possibile utilizzo delle citochine *low dose* nell'ambito della sindrome metabolica. Pertanto sarà interessante proseguire lo studio di tali molecole su una linea di pre-adipociti umani, in quanto le 3T3-L1 si sono dimostrate non rappresentare il modello cellulare più adeguato, essendo una linea pre-adipocitaria. Allo stesso tempo i risultati ottenuti sulle ASC appaiono molto incoraggianti, in quanto il ripristino delle funzioni regolatorie e modulatorie di queste cellule rappresenta tutt'oggi una nuova strategia terapeutica per combattere l'obesità e le patologie ad essa associate.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Ames RP. *A comparison of blood lipid and blood pressure responses during the treatment of systemic hypertension with indapamide and with thiazides.* American Journal of Cardiology, 1996.
- Barygina V, Becatti M, Lotti T, Moretti S, Taddei N and Fiorillo C. *Treatment with low-dose cytokines reduces oxidative-mediated injury in perilesional keratinocytes from vitiligo skin.* Journal of dermatological science, 2015.
- Barygina V, Becatti M, Lotti T, Taddei N and Fiorillo C. *Low dose cytokines reduce oxidative stress in primary lesional fibroblasts obtained from psoriatic patients.* Journal Dermatology Science, 2016.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. *Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes.* Journal of biological chemistry, 2004.
- Cardani D, Dusio GF, Luchini P, Sciarabba M, Solimene U, Rumio C. *Oral administration of Interleuchin-10 and anti-IL-1 antibody ameliorates experimental intestinal inflammation.* Gastroenterology research, 2013.
- Castro AM, Macedo-de la Concha LE and Pantoja-Melendez CA. *Low Grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases.* Revista medica del hospital general de mexico, Agosto 2016.
- Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX and Reiter RJ. *Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review.* Journal of Pineal Research, 2014.
- Crampton SP, Davis J and Hughes CWC. *Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).* Journal of visualized experiments, 2007.
- Dipartimento scientifico GUNA. *LOW DOSE MEDICINE: Highlights sulla ricerca di base e clinica.* 2017.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M. *Effect of the Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial.* JAMA, 2004.
- Esser N, Paquot N and Scheen A. *Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease.* Informa health care, 2014.
- Frohlic M, Imhof A, Berg G. *Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study.* Diabetes Care, 2000.

- Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L and Palomo I. *Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome*. Mediators of inflammation, volume 2013.
- Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Dusio GF, Mauro V, Solimene U. *Low dose oral administration of cytokines for treatment of allergic asthma*. Pulmonary Pharmacological Therapy, 2009.
- Goddeke S, Knebel B, Fahlbusch P, Horbelt T, Poschmann G, van de Velde F, Benninghoff T, Al-Hasani H, Jacob S, Van Nieuwenhove Y, Lapauw B, Lehr S, Ouwens DM, Kotzka J. *CDH13 abundance interferes with adipocyte differentiation and is a novel biomarker for adipose tissue health*. International journal of obesity, 2018.
- Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, et al. . *Vascular effects of improving metabolic control with metformin or rosiglitazone in type 2 diabetes*. Diabetes care, 2004.
- Gotoh k, Fujiwara K, Anai M, Okamoto M, Masaki T, Kakuma T and Shibata H. *Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity*. Review. Endocrinology Journal, 2017.
- Hu JY, Park YJ, Ham M and Kim JB. *Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity*. Molecules and cells, April 2014.
- International diabetes federation: the IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>.
- Jais A, Bruning JC. *Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease*. The journal of clinical investigation, 2017.
- Kaur J. *A comprehensive review on metabolic syndrome*. Cardiology research and practice, March 2014.
- Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. *Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes*. Endocrinology, 2007.
- Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. *Lipolysis: a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores*. Progress in lipid research, 2011.
- Lewis GF and Steiner G. *Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans: implications for the insulin-resistant state*. Diabetes care, 1996.

- Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ. *Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cell reduce diet-induced obesity and diabetes in mice*. Nature Medicine, 2009.
- Louwen F, Ritter A, Kreis NN and Yuan J. *Insight into development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells*. Obesity reviews, July 2018.
- Martin-Martin LS, Giovannangeli F, Bizzi E, Massafra U, Ballanti E, Cassol M, Migliore A. *An open randomized active-controlled clinical trial with low-dose SKA cytokines versus DMARDs evaluating low disease activity maintenance in patients with rheumatoid arthritis*. Drug Design, Development and Therapy, 2017.
- Matfin G. *Developing therapies for the metabolic syndrome: challenges, opportunities, and ... the unknown*. Therapeutic advances in endocrinology and metabolism, 2010.
- Mathis D. *Immunological goings-on in visceral adipose tissue*. Cell metabolism, 2013.
- Mayas MD, Ortega FJ, Macias-Gonzalez M, Bernal R, Gomez-Huelgas R, Fernandez-Real JM and Tinahones FJ. *Inverse relation between FASN expression in human adipose tissue and the insulin resistance level*. Nutrition&Metabolism, 2010.
- Monteiro R and Azavedo I. *Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome*. Mediators of inflammation, June 2010.
- Morse SA, Zhang R, Thakur V and Reisin E. *Hypertension and the metabolic syndrome*. The American journal of the medical sciences, 2005.
- Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I. *Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation*. Cell Metabolism, 2013.
- Oliva-Olivera W, Moreno-Indias I, Coin-Araguez L. *Different response to hypoxia of adipose-derived multipotent cells from obese subjects with and without metabolic syndrome*. PloS One, 2017.
- Onate B, Vilahur G, Camino-Lopez S. *Stem cell isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype*. BMC Genomics, 2013.
- Pan XR, Li GW, Hu YH. *Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance*. Diabetes Care, 1997.
- Perez LM, Suarez J, Bernal A, De Lucas B, San Martin N and Gálvez BG. *Obesity-driven alterations in adipose-derived stem cells are partially restored by weight loss*. Obesity biology and integrated physiology, 2016.

- Peterson KF and Shulman GI. *Ethiology of insulin resistance*. The American journal of medicine, 2006.
- Qiao Q, Gao W, Zhang L, Nyamdorj R and Tuomilehto J. *Metabolic syndrome and cardiovascular disease*. The association for clinical biochemistry, 2007.
- Radice E, Miranda V, Bellone G. *Low-doses of sequential-kinetic-activated interferon- $\gamma$  enhance the ex vivo cytotoxicity of peripheral blood natural killer cells from patients with early stage colorectal cancer. A preliminary study*. International Immunopharmacology, 2014.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP and Hennekens CH. *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. The new England journal of medicine, 1997.
- Sattiel AR and Olefsky JM. *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease*. The journal of clinical investigation, January 2017.
- Say YH. *The association of insertions/deletions (INDELS) and variable number tandem repeats (VNTRs) with obesity and its related traits and complications*. Journal Physiology Anthropology, 2017.
- Swezey Laurie. *How obesity impacts wound healing*. Wound Source, 2015.
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O and Rossner S. *Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study*. Lancet, 2005.
- Yehui D, Liming Z, Changbing Z, Bo S, Fengna L, Xiangfeng K and Kang X. *Inflammatory links between high fat diets and diseases*. Frontiers in immunology, 2018.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Molecular Biology Cell, 2002.
- Zuliani G, Morieri ML, Passaro A, Vigna GB, Vitolo E and Solini A. *Sindrome metabolica e infiammazione sistemica*. Giornale italiano di oncologia, January 2012.