



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Metodologia Clinica, Scienze Endocrinologiche e Diabetologiche

CICLO: 27°

Caratterizzazione delle cellule staminali del tessuto adiposo nell'obesità e nel diabete: effetto del calo ponderale

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisor: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Dr. Gabriella Milan

Dottorando : Fabio Stasi

*“Vì cà ci non ci studí.....
ALLA POMPA TÌ LA BENZINA TÌ TOCCA!!”*

Cit. Papà

INDICE

ABSTRACT	9
ABSTRACT (ENGLISH VERSION)	11
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	15
INTRODUZIONE	19
1. I diversi fenotipi di tessuto adiposo: WAT, BAT e Beige	19
1.1 Origini cellulari del WAT	19
1.2 Origini cellulari del BAT e del Beige	25
2. La Frazione Vasculo Stromale (SVF): composizione cellulare e principali marcatori dei preadipociti (ADSC)	33
2.1 Il CD34	33
2.2 Pref-1	36
2.3 Zfp423	37
2.4 Altri marcatori	39
3. ADSC: un possibile ruolo nell'insorgenza dell'obesità?	42
SCOPO DELLA TESI	45
MATERIALI E METODI	47
1. Reclutamento dei pazienti	47
2. Processamento del tessuto adiposo ex-vivo	48
3. Composizione del Medium adipogenico (MAD)	49
4. Estrazione dell'RNA da cellule e da tessuto adiposo, trattamento con DNasi e retrotrascrizione	50
5. Analisi dei livelli di mRNA mediante Real time PCR	52

6. Analisi citofluorimetrica	53
7. Immunofluorescenza	55
8. Analisi statistica	55
RISULTATI	57
1. Analisi del pattern di espressione dei marcatori CD45 e CD31 nelle cellule della SVF	57
2. La popolazione di preadipociti CD34+/CD31-/CD45- è presente in quantità differenti dei due diversi depositi di tessuto adiposo	59
3. CD271 e gli altri marcatori delle cellule staminali mesenchimali della SVF	63
4. CD146: analisi citofluorimetrica di un ipotetico marcatore universale di staminalità	65
5. Le cellule della SVF riducono progressivamente il potenziale adipogenico in vitro e l'espressione del CD34	68
6. Valutazione del contributo adipogenico di singole sottopopolazioni cellulari della SVF	72
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	75
PROSPETTIVE FUTURE	83
BIBLIOGRAFIA	85

ABSTRACT

INTRODUZIONE: la frazione vasculo stromale (SVF) del tessuto adiposo umano contiene differenti sottopopolazioni identificate da specifici marcatori di membrana (CD). Abbiamo focalizzato l'attenzione sul ruolo dei preadipociti (CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻), precursori endoteliali (CD34⁺/CD31⁺/CD45⁻) e periciti (CD146⁺) nell'obesità e rimodellamento del tessuto adiposo, e la possibile correlazione patologica nel contenuto di preadipociti nello sviluppo dell'obesità.

MATERIALI E METODI: tessuto adiposo sottocutaneo addominale (SAT) e viscerale (VAT) sono stati prelevati da 7 pazienti obesi e 6 pazienti obesi con diabete mellito di tipo 2 (DM2) sottoposti a bendaggio gastrico, 7 pazienti post-obesi sottoposti ad operazione di chirurgia plastica (addominoplastica) dopo calo ponderale superiore ai 10 Kg. La SVF è isolata mediante digestione enzimatica con collagenasi e caratterizzata misurando la co-espressione del CD34 con il CD90, CD73, CD13, CD29, CD271, CD31, CD146 mediante citofluorimetria. Abbiamo valutato i profili di espressione genica mediante qPCR, analisi del potenziale adipogenico, capacità proliferativa e caratteristiche morfologiche durante i passaggi in coltura. Abbiamo effettuato sorting mediante FACS delle differenti sottopopolazioni della SVF e valutato in vitro il loro potenziale adipogenico.

RISULTATI: Le analisi citofluorimetriche hanno rivelato una % più alta di preadipociti nel VAT rispetto al SAT, con differenze significative nei pazienti obesi DM2 (41.9% ± 3.2% VAT vs 23.1% ± 2.9% SAT) e un consistente incremento dei preadipociti nel SAT dei post-obesi, fino al 70%. Risultano invece percentuali maggiori di precursori endoteliali nel SAT rispetto al VAT, per

entrambe le categorie di pazienti. Le cellule della SVF risultano positive per la maggior parte dei marcatori delle staminali mesenchimali (CD13, CD29, CD90, CD73) ad eccezione del CD271 il quale mostra differenze tra i due depositi adiposi analizzati. Infine, vi è un contenuto maggiore di periciti CD146+/CD31-/CD34- nel SAT degli obesi e degli obesi DM2, e un quantitativo superiore di cellule CD146+/CD31+/CD34- soprattutto nel SAT degli obesi affetti da DM2. La SVF ex-vivo (P0) mostra il potenziale adipogenico più elevato che diminuisce durante i passaggi in coltura (P1-P4) insieme alla down-regolazione dell'mRNA del CD34 e di Zfp423, e alla up-regolazione del CD90. Abbiamo osservato un incremento nelle dimensioni cellulari e nucleari, insieme a cambiamenti delle strutture citoscheletriche. La frazione dei preadipociti ha mostrato il più alto potenziale adipogenico.

CONCLUSIONI: il VAT degli obesi e degli obesi DM2, con un contenuto maggiore di preadipociti dimostra possedere maggiori caratteristiche iperplastiche rispetto al SAT, il quale avendo un numero maggiore di precursori endoteliali e di periciti presenta maggiori caratteristiche pro-angiogeniche. Tuttavia, in condizioni di calo ponderale che avviene nei pazienti obesi in seguito a trattamento chirurgico, il SAT acquisisce le caratteristiche del VAT nelle condizioni di obesità, aumentando il contenuto in preadipociti. La perdita del potenziale adipogenico associata alla down-regolazione del CD34, e la presenza di tale marcatore nei preadipociti della SVF dimostra un suo forte coinvolgimento nell'adipogenesi. Le cellule della SVF vanno incontro a profondi cambiamenti morfologici durante l'espansione in vitro, suggerendo una possibile connessione tra le strutture citoscheletriche e l'espressione di marcatori della staminalità.

ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

INTRODUCTION: The Stromal Vascular Fraction (SVF) of human adipose tissue (AT) contains different subpopulations identified by specific CD membrane markers. We focused on the role of preadipocytes (CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻), endothelial precursors (CD34⁺/CD31⁺/CD45⁻) and pericytes (CD146⁺) in obesity and AT remodeling, and the possible pathological correlation between the preadipocyte content and obesity development.

MATERIALS AND METHODS: Abdominal subcutaneous (SAT) and visceral AT (VAT) were obtained from 7 obese and 6 obese/diabetic patients underwent sleeve gastrectomy, 7 obese patients underwent plastic surgery or cholecystectomy after a >10kg weight loss. SVF was isolated by collagenase digestion and characterized measuring the co-expression of CD34, CD90, CD73, CD13, CD29, CD271, CD31, CD146 by flow cytometry. We evaluated the expression profiles by qPCR, adipogenic potential, proliferation capacity and morphological features during culture. We sorted by FACS the different subpopulations and in vitro evaluated their adipogenic and angiogenic potential.

RESULTS: The flow cytometric analysis revealed a higher % of preadipocytes in VAT than in SAT, with significant differences in obese DM2 (41.9 % ± 3.2 % VAT vs 23.1 % ± 2.9 % SAT) and a significant increase in preadipocytes in SAT of post-obese, up to 70%. Are rather higher percentages of endothelial precursors in SAT than in VAT, for both categories of patients. SVF cells are positive for most of the markers of mesenchymal stem cells (CD13, CD29, CD90, CD73) with the exception of CD271 which shows differences between the two fat depots analyzed. Finally, there is a higher content of CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻ pericytes in

SAT of the obese and obese DM2, and a greater portion of cells CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻ especially in SAT of the obese with DM2. The SVF ex vivo (P0) shows the higher adipogenic potential that decreases during the passages in culture (P1-P4) along with the down-regulation of CD34 mRNA and Zfp423, and the up-regulation of CD90. We observed an increase in cell size and nuclear dimensions, along with changes in cytoskeletal structures. The subpopulation of preadipocytes showed the highest adipogenic potential.

CONCLUSIONS: the VAT of obese and obese DM2, with a higher content of preadipocytes shows more hyperplastic features than SAT, which having a greater number of endothelial progenitor cells and pericytes has more pro-angiogenic features. However, under conditions of weight loss that occurs in obese patients following surgical treatment, SAT acquires the characteristics of the VAT in the conditions of obesity, increasing the content in preadipocytes. The loss of adipogenic potential associated with the down-regulation of CD34, and the presence of this marker in preadipocytes of SVF demonstrates its strong involvement in adipogenesis. SVF cells undergo deep morphological changes during expansion in vitro, suggesting a possible connection between the cytoskeletal structures and the expression of stem cell markers.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ADSC	Adipose Stem Cell
BAT	Brown Adipose Tissue
BMI	Body Mass Index
BrdU	Bromodeossiuridina
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	Adenosinamonomofosfato ciclico
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	DNA complementare
Dlk1	Protein Delta homolog 1
DM2	Diabetic Mellitus 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	deossinucleotidetrifosfato
FABP4	Fatty Acid Binding Protein 4
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FDG	[¹⁸ F]-2-fluoro-D-2-glucosio
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC-H	Forward Scattering
GFP	Green Fluorescent Protein
HFD	High Fat Diet
HOXC	Homeobox protein

IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
KO	Knock-Out
LHX8	LIM homeobox
MAD	Medium Adipogenico
MAF	Frazione di adipociti maturi
miRNA	microRNA
MLV	Murine Leukemia Virus
mRNA	RNA messaggero
MSC	Mesenchymal Stromal Cell
Myf5	Myogenic factor 5
Pax3	Paired box 3
PBS	Phosphate Buffer Saline
PerCP	Peridinin chlorophyll
PET	Positron Emission Tomography
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PRDM16	PR domain containing 16
Pref-1	Preadipocyte factor 1
RNA	Acido ribonucleico
RNAi	RNA interfering
SAT	Subcutaneous Adipose Tissue
SD	Standard Deviation

SEM	Standard Error of the Mean
SSC-H	Side Scattering
SVF	Stromal Vascular Fraction
TBX1	T-box transcription factor 1
TMEM26	Transmembrane protein 26
Ucp-1	Uncoupling Protein-1
VAT	Visceral Adipose Tissue
WAT	White Adipose Tissue
Wt1	Wilm's Tumour gene
YFP	Yellow Fluorescent Protein
Zfp423	Zinc Finger Protein 423
ZIC1	Zinc finger of the cerebellum 1

INTRODUZIONE

1. I diversi fenotipi di tessuto adiposo: WAT, BAT e Beige

1.1 Origini cellulari del WAT

Un paradigma ben consolidato negli studi sulla biologia del tessuto adiposo è che le cellule adipose siano generate da progenitori mesenchimali di origine mesodermica (Majka et al., 2011). Preadipociti predisposti a formare adipociti maturi e le cellule staminali capaci di fornire differenziamenti in diversi tipi cellulari (endoteliali, adipociti, cartilaginei e ossei) possono essere isolati dallo stroma del tessuto adiposo (Guilak, et al., 2006). Tali cellule risultano presenti durante tutto il ciclo vitale di ogni essere umano (circa il 10% degli adipociti sono generati ogni anno) (Spalding, et al., 2008). Studi iniziali per identificare e localizzare cellule progenitrici residenti nel tessuto adiposo sono stati messi a punto dal gruppo di Graff e collaboratori, i quali generarono modelli di analisi di *lineage* cellulare basati sul concetto che il *transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)* è il regolatore principale dell'adipogenesi (Tang, et al., 2008). I risultati delle loro ricerche hanno chiarito che la produzione del PPAR γ non avviene prima del secondo giorno post-natale, suggerendo che le cellule progenitrici esprimenti PPAR γ predisposte a generare cellule bianche, risultavano essere prodotte nel periodo prenatale.

Altre ricerche hanno proposto un'origine degli adipociti che avviene nel midollo osseo, i quali si indirizzano nel tessuto adiposo e che successivamente vengono sottoposti a conversione adipogenica. Tale ipotesi è stata confermata trapiantando

cellule del midollo osseo marcate con GFP in topi wild-type. Analizzando la fluorescenza emanata dalle cellule esprimenti la GFP di derivazione midollare e che hanno dato origine ad adipociti maturi, è stato osservato un numero maggiore di cellule fluorescenti nel tessuto adiposo viscerale (VAT) rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) (Crossno et al., 2006). Da studi iniziali effettuati sulle cellule stromali adipose umane da Tchkonina e collaboratori è stato rivelato che le cellule stromali provenienti da SAT accumulavano più lipidi e esprimevano maggiormente e precocemente i tipici marker adipogenici (PPAR γ 2, CCAAT/enhancer binding protein α , e FABP4) rispetto alle cellule stromali derivate da VAT isolate dallo stesso paziente (Tchkonina et al., 2001). Inoltre, trovarono che i preadipociti sottocutanei clonati differenziavano molto più rapidamente rispetto alle cellule omentali, ed erano riusciti ad ottenere una percentuale maggiore di cellule sottocutanee in coltura che davano origine ad adipociti maturi rispetto a quelle omentali.

Billon e collaboratori hanno inoltre suggerito una derivazione degli adipociti bianchi dal neuroectoderma (Billon et al., 2006). Loro hanno dimostrato infatti che le cellule neuroepiteliali selezionate da cellule embrionali di topo hanno la capacità di generare adipociti maturi. Per confermare questa ipotesi in vivo, i ricercatori hanno utilizzato topi in cui il promotore genico del gene Sox10 (fortemente espresso nella cresta neurale ma non nel mesoderma) guidava l'espressione della Cre-ricombinasi nelle cellule derivate dalla cresta neurale, rendendole competenti di esprimere la Yellow Fluorescent Protein (YFP). La fluorescenza emanata da questa proteina che veniva identificata successivamente negli adipociti rilevati nel tessuto adiposo cefalico, confermano un'origine degli adipociti anche ad opera della cresta neurale (Billon et al., 2006).

Uno dei metodi migliori per studiare l'origine cellulare delle cellule progenitrici del White Adipose Tissue (WAT) prevede di sfruttare la tecnica del cell sorting mediante l'utilizzo del citofluorimetro (Rodeheffer et al., 2008; Festa, E., 2001; Uezumi et al., 2010). Due popolazioni cellulari derivate da WAT, aventi un profilo di marcatori Lin^- : CD34^+ : CD29^+ : SCA-1^+ : CD24^+ e Lin^- : CD34^+ : CD29^+ : SCA-1^+ : CD24^- risultano adipogeniche in vitro ma solo la popolazione CD24^+ è capace di generare un deposito di WAT funzionale in seguito a trapianto dello stesso in topi lipodistrofici, suggerendo che la popolazione CD24^+ contiene progenitori adipocitari (Rodeheffer, et al., 2008).

Un altro studio di lineage cellulare mostrava che, incrociando topi cadherin-5- (Cdh5)-Cre con topi che esprimevano la citoplasmica β - Galattosidasi e GFP, si ottenevano adipociti maturi marcati dalla Cdh5-Cre, suggerendo una origine endoteliale per gli adipociti bianchi (Tran et al., 2012; Tang et al., 2008). Berry e Rodeheffer hanno utilizzato anch'essi modelli di topi Cre-ricombinasi per effettuare studi di lineage cellular tracking in vivo (Berry R. e Rodeheffer M. S., 2013). Grazie ai loro modelli animali hanno dimostrato che gli adipociti maturi non hanno un'origine di tipo ematopoietica, in contrasto da quanto affermato con alcuni gruppi di ricerca che affermavano una origine degli adipociti dalle cellule circolanti nel sangue (Crossno et al., 2006; Sera et al., 2009). Per determinare poi se cellule ematopoietiche contribuiscano alla formazione di adipociti maturi nel contesto dell'obesità, i topi Cdh5-Cre sono stati sottoposti ad High Fat Diet (HFD). Dopo 10 settimane di trattamento, non venivano osservati adipociti fluorescenti esprimenti la GFP nel WAT, dimostrando che cellule endoteliali non contribuiscono alla formazione degli adipociti maturi nell'obesità indotta da HFD (Berry R. e Rodeheffer M. S., 2013). Lo stesso gruppo di ricerca ha sviluppato un

modello di topo esprime il Platelet-derived growth factor ($\text{Pdgfr}\alpha$) sotto la guida del promotore per la Cre-ricombinasi. In questo modo è stato possibile analizzare una ipotetica derivazione endoteliale e angiogenica di adipociti maturi di tipo bianco durante la formazione del WAT. Analizzando la Stromal Vascular Fraction (SVF) di questi modelli di topi, è stato osservato che sia le cellule CD24^+ che le CD24^- venivano marcate dal $\text{Pdgfr}\alpha$, e in vitro erano in grado di fornire adipociti maturi. È stato quindi dimostrato che queste due popolazioni cellulari sono parte del lineage cellulare adipocitario in vivo, e che hanno origine da cellule $\text{Pdgfr}\alpha$ durante il normale sviluppo del WAT. Dati successivi hanno poi dimostrato che le cellule della SVF CD24^+ perdono progressivamente questo marcatore e diventano CD24^- in grado di differenziare in senso adipogenico in vivo, ed esprimendo il classico profilo di marcatori dell'adipogenesi (Berry R. e Rodeheffer M. S., 2013).

Cellule esprimenti sulla superficie i marcatori $\text{Pdgfr}\alpha$, CD34 e Sca-1 sono in grado di proliferare e differenziare in adipociti bianchi uniloculari in topi sottoposti ad HFD (Lee e Granneman, 2012; Lee et al., 2012) ma anche in adipociti bruni multiloculari esprimenti la Uncoupling-protein1 (Ucp-1) se sottoposte a trattamento con sostanze β -adrenergiche (Lee et al., 2012). Questi dati indicano che le cellule staminali Pdgfr^+ hanno l'elevato potenziale di dare origine sia a cellule brune che bianche in base alla diversa natura dei segnali induttori (Lee et al., 2013).

Diversi studi hanno focalizzato l'attenzione sull'ipotesi dell'esistenza delle Adipose Stem Cells (ASCs) attorno ai vasi sanguigni (Andersen et al., 2008; Lin et al., 2008; Tang et al., 2008). Il gruppo di Cai et al nel 2011 ha provato la presenza delle ASCs all'interno della popolazione pericitaria che circonda le

pareti dei vasi sanguigni nel tessuto adiposo. Utilizzando modelli murini transgenici e sfruttando la fluorescenza della GFP sotto la guida del promotore α SMA, i ricercatori hanno infatti dimostrato che solo le cellule GFP⁺ possedevano le proprietà di pluripotenza e una certa predisposizione verso il differenziamento adipogenico, condrogenico e osteogenico, al contrario delle cellule GFP⁻ (Cai et al., 2011). In questo modo è stata provata l'esistenza di cellule staminali adipose pluripotenti che originano da cellule perivascolari e che esprimono α SMA durante il differenziamento. È noto infatti che le cellule perivascolari sono principalmente composte da periciti e da cellule muscolari derivanti dai periciti stessi. Questi, inoltre, giocano un ruolo fondamentale nella rigenerazione tissutale e nella vascolarizzazione (Doherty et al., 1998; Kang et al., 2009).

Sebbene sono stati ottenuti diversi successi nello studio dei precursori del WAT, le origini embriologiche dei diversi depositi di WAT rimane ancora una questione dibattuta (Rodeheffer et al., 2008; Berry et al., 2011). Analisi sul trascrittoma di preadipociti isolati dalla SVF di tessuto adiposo ha rivelato delle consistenti differenze nel profilo di espressione genica dello sviluppo tra il tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) e viscerale (VAT) (Macotela et al., 2012; Yamamoto et al., 2010). Tuttavia, in uno studio effettuato sui depositi umani era stato concluso che i preadipociti del WAT mesenterico avevano un profilo d'espressione più simile ai preadipociti sottocutanei rispetto a quelli viscerali. In particolare, analizzando il profilo d'espressione genica del Wilm's tumour gene (Wt1), principale regolatore dei progenitori mesenchimali e che è coinvolto nello sviluppo dei reni e del cuore (Martinez et al., 2010; Essafi et al., 2010), vi è una stretta correlazione tra l'espressione del gene in questione e la localizzazione di sei depositi di tessuto adiposo viscerale (Chau et al., 2011). Nel 2013, il gruppo di Chau ha realizzato un

modello murino knock-in Wt1-GFP, dal quale ha estratto la SVF e la frazione di adipociti maturi. In questo modo è emerso che vi è una maggior presenza di cellule Wt1⁺ nella SVF di WAT epididimale, mesenterico, retroperitoneale, omentale, epicardiale e perirenale rispetto agli altri depositi adiposi (Chau et al., 2014). Vi era invece una assenza di cellule Wt1⁺ nel tessuto adiposo sottocutaneo e bruno (BAT). Inoltre, in un esperimento in cui il gene Wt1 è stato deletato si rilevava un calo della fluorescenza delle cellule GFP⁺ nella popolazione di cellule Lin⁻CD31⁻CD29⁺CD34⁺Scal⁺CD24⁻ in tutti i depositi di grasso analizzati, con differenze statisticamente significative nel tessuto adiposo omentale e epididimale. Nello stesso studio è stato poi dimostrato che il WAT viscerale esprime Wt1 possiede anche un profilo di espressione mesoteliale: infatti cellule epididimali mesoteliali ex-vivo che esprimono Wt1 possono produrre adipociti in vitro.

Il tessuto adiposo bianco viscerale è noto essere coinvolto nel fenomeno dell'obesità. Gli individui obesi che hanno il tessuto adiposo viscerale espanso vanno incontro a un rischio maggiore di insorgenza di malattie quali diabete e disfunzioni cardiovascolari se confrontati con gli individui obesi che immagazzinano un eccesso di energia nel tessuto adiposo sottocutaneo (Abate et al., 1995; Miyazaki e DeFronzo, 2009; McLaughline et al., 2011). Infatti, l'espansione del SAT può essere potenzialmente protettivo contro le complicazioni metaboliche derivanti da una dieta ricca di grassi (Kim et al., 2007; Kusminski et al., 2012). L'ipertrofia degli adipociti che è strettamente correlata con una patologica espansione del WAT, è la componente maggiore della sindrome metabolica negli individui obesi (Sun K. et al., 2011). Sia l'ipertrofia che l'iperplasia degli adipociti contribuiscono all'espansione del tessuto adiposo durante una dieta ricca di grassi (Sun K. et al., 2011; Prins e O'Rahilly, 1997).

Studi recenti hanno fatto chiarezza sul ruolo dell'adipogenesi ad opera delle cellule progenitrici adipogeniche (Tang et al., 2008; Rodeheffer et al., 2008; Gupta et al., 2010; Tran et al., 2012; Wu et al., 2012). Per meglio comprendere la dinamica degli adipociti in vivo nei differenti depositi di tessuto adiposo, il gruppo di Wang ha sviluppato un modello di topo inducibile da doxyciclina e definito come AdipoChaser mouse. Grazie a questo modello murino è stato reso possibile seguire il destino cellulare degli adipociti maturi in vivo, marcando quelli già preesistenti nell'organismo. I risultati ottenuti hanno rivelato che sia il tessuto adiposo sottocutaneo che quello epididimale hanno una ridotta adipogenesi negli animali sottoposti a una dieta ricca di carboidrati. Sottoponendo invece gli animali per due mesi a una dieta ricca di grassi, il SAT si dimostrava essere il deposito con la più bassa capacità adipogenica. Il tessuto adiposo epididimale invece si è dimostrato essere il deposito con la più alta capacità adipogenica se sottoposto a HFD. Probabilmente, entrambi i tessuti non possiedono la stessa composizione di progenitori cellulari che contribuiscono in maniera diversa ai processi di differenziamento adipogenico ed espansione adipogenica (Wang A. Q. et al., 2013).

1.2 Origini cellulari del BAT e del Beige

Nei mammiferi il tessuto adiposo non è solo composto da adipociti bianchi che hanno il compito di immagazzinare trigliceridi, ma anche da adipociti bruni che sono fondamentali per l'attuazione del programma termogenico sia basale che inducibile. Tale fenomeno avviene attraverso l'espressione della Uncoupling protein-1 (Ucp-1), una proteina di 32 kDa che risiede nella membrana

mitocondriale interna e che consente la dissipazione del gradiente protonico elettrochimico generato durante la respirazione nella forma di calore (Cannon e Nedergaard, 2004). Nei roditori, il tessuto adiposo bruno (BAT) è molto più abbondante nel periodo neonatale ed è concentrato nella regione interscapolare. Adipociti bruni possono inoltre essere localizzati in alcune aree di depositi di WAT, in seguito ad esposizione al freddo (Cinti, 2005). Nei feti umani e nei neonati invece, il BAT risiede nelle regioni ascellari, cervicali, perirenali e periadrenali (Cannon e Nedergaard, 2004) ma diminuisce rapidamente dopo la nascita, fino ad essere presente a livelli irrilevanti negli adulti, ad eccezione nei pazienti affetti da feocromocitoma, dove l'attività adrenergica risulta estremamente elevata (English et al., 1973) o nei soggetti che vivono nelle regioni fredde del mondo dove l'esposizione al freddo risulta essere prolungata (Huttunen et al., 1981). Tuttavia, da recenti studi in cui ad alcuni pazienti normopeso è stato somministrato il [^{18}F]-2-fluoro-D-2-deossi-D-glucosio (FDG), in seguito ad analisi con la tomografia ad emissione di positroni (PET) sono state rilevate delle aree di tessuto adiposo bruno metabolicamente attive nelle regioni cervicali, sopraclavicolari, ascellari e paravertebrali (Nedergaard et al., 2007). Nei topi, è stato dimostrato che la rimozione di BAT provocava obesità indotta da dieta, diabete e iperlipidemia (Lowell et al., 1993). Inoltre, la delezione di UCP-1 in topi Knock-out (KO) provocava obesità in seguito a dieta (Kontani et al., 2005).

Come per il WAT, anche per il BAT è stata proposta un'origine mesodermica. In embrioni di ratto, quando al nono giorno di sviluppo si forma il mesoderma attorno alla capsula renale, esso sviluppa solo in BAT (Loncar, 1992). Ciò che contraddistingue gli adipociti bruni dai bianchi non è solo una differente caratteristica morfologica. Nel BAT vi è infatti una precisa espressione di un

pattern genico che lo contraddistingue chiaramente dal WAT. Oltre infatti all'espressione di UCP-1, generalmente accettato come marcatore principale del grasso bruno, vi è l'espressione del Cell death-inducing DFF45-like effector A (Cidea), il coattivatore nucleare PGC-1 α e altri fattori coinvolti nella biogenesi mitocondriale (Gesta et al., 2007). Tali geni sono preferenzialmente espressi nel BAT, mentre la leptina, il corepressore nucleare RIP140 e la matrix protein fibrillin-1 sono molto più espresse nel WAT. Recentemente, è stata scoperta una Zinc-finger containing protein (PRDM16) che viene espressa selettivamente nelle cellule brune. Inducendo la sua espressione in cellule bianche o nel WAT in vivo si attiva un fenotipo da grasso bruno (Seale et al., 2007). Il differenziamento degli adipociti bruni è fortemente stimolato da agenti adrenergici quali norepinefrine. Tali stimoli promuovono la proliferazione e il differenziamento degli adipociti bruni, proteggendoli da apoptosi ed amplificando la capacità termogenica del BAT inducendo l'espressione di UCP-1 (Cannon e Nedergaard, 2004). L'esposizione al freddo aumenta l'attività del BAT mediante le norepinefrine rilasciate dal sistema nervoso simpatico. Altri stimoli che inducono l'espressione di UCP-1 includono ormoni tiroidei, insulina, tiazolidinedioni, acido retinoico, analoghi del cAMP e agonisti β -adrenergici (Diehl e Hoek, 1999).

Atit et al. nel 2006 aveva proposto una origine comune per il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo bruno. Secondo le loro scoperte, specifiche cellule del dermomioma possono dare origine sia a cellule muscolari che ad adipociti bruni, ma non adipociti bianchi (Atit et al., 2006). Dalle analisi dei profili di espressione genica, è risultato che l'espressione del marcatore Myf5 avviene sia nel muscolo che nel BAT ad esclusione degli adipociti bianchi. In esperimenti di lineage tracking effettuati da Seale et al. in vivo, è stato dimostrato come il marcatore

Myf5 sia esclusivo solo di due tipi cellulari, ossia degli adipociti bruni e dei miociti (Seale et al., 2008). Queste conclusioni sono supportate dal fatto che inducendo l'espressione di PRDM16 in colture di mioblasti, esse sono in grado di transdifferenziare in adipociti bruni. Al contrario, silenziando l'espressione di PRDM16 si induceva miogenesi. Tuttavia, inducendo la formazione di adipociti bruni (o beige) ottenuti mediante stimolazione adrenergica, essi risultavano negativi per l'espressione di Myf5, suggerendo un'altra via di origine degli adipociti bruni che non esprime mai Myf5. Tali cellule sono disperse all'interno del tessuto adiposo bianco e probabilmente sono generati da precursori cellulari inattivi (Enerbäck S., 2009). Diversamente, cellule brune che sono derivate da cellule Myf5⁺ sono localizzate attorno ai reni e vicino alle scapole. Un'ipotetica via di derivazione delle cellule brune Myf5⁻ indotte da stimoli adrenergici potrebbe coinvolgere i periciti, al contrario delle cellule muscolari e degli adipociti bruni che sono derivati da un pool di cellule nel dermomioma (Fig. 1).

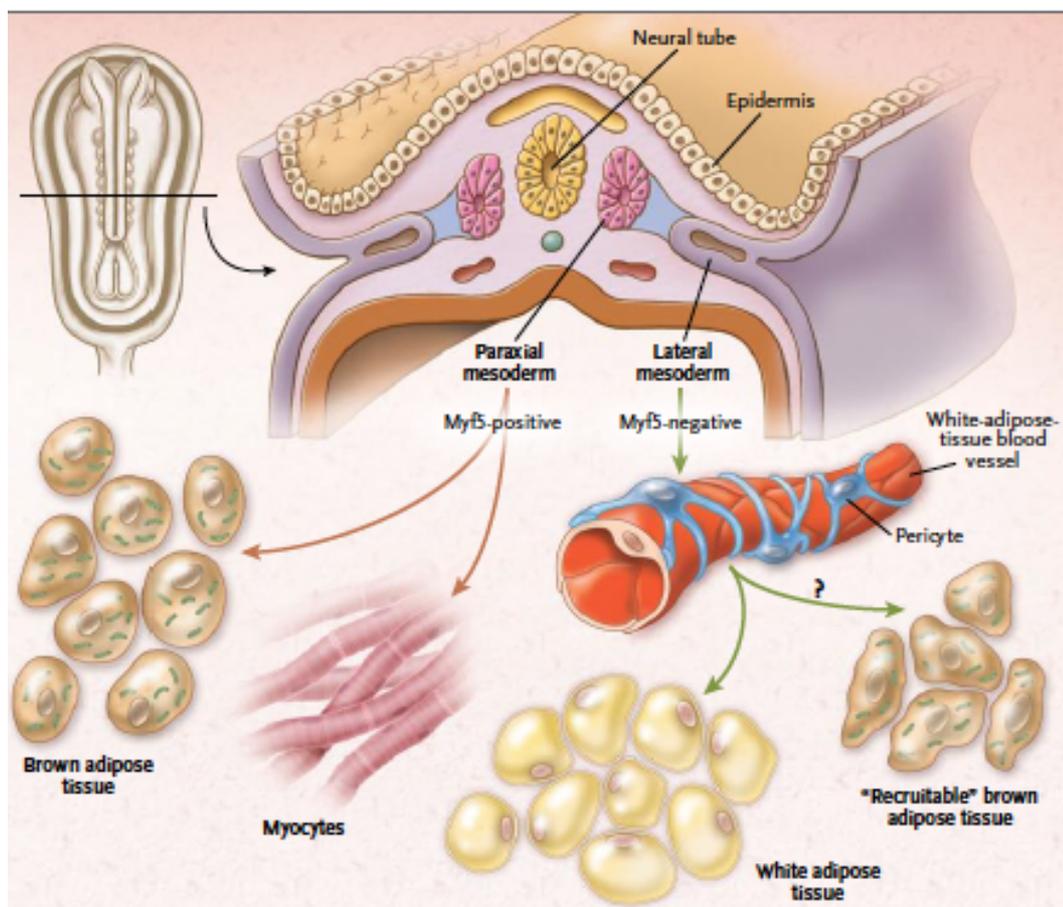


Fig.1 : gli adipociti bianchi sono Myf5 negativi e sono derivati dai periciti che circondano i vasi sanguigni. Gli adipociti bruni interscapolari e le cellule muscolari sono Myf5 positivi, mentre gli adipociti bruni indotti a differenziare mediante stimoli adrenergici sono derivati da precursori Myf5 negativi, come gli adipociti bianchi. (Enerbäck S., 2009).

Depositi di tessuto adiposo bruno inducibile nell'uomo sono stati rilevati nel WAT che circonda la ghiandola adrenale, quando la medulla sviluppa un tumore noto col termine di feocromocitoma in grado di secernere catecolammine (Lenders et al., 2005). Tali catecolammine stimolano il tessuto adiposo periadrenale bianco che incapsula il tumore, rendendolo in grado di transdifferenziare in tessuto adiposo bruno o beige. Cinti e collaboratori hanno dimostrato infatti che gli adipociti bianchi maturi sono in grado di transdifferenziare in adipociti bruni sotto determinati stimoli (Frontini et al., 2013; Barneda et al., 2013). È stata dimostrata

la possibilità di ottenere precursori bruni a partire dal tessuto adiposo che circonda il feocromocitoma. Il WAT sottoposto a stimolazione continua da parte della catecolammine diventa in grado di esprimere determinati marcatori del bruno e del beige, quali CD137, TBX1 e ZIC1. Confrontando i risultati di espressione genica e di differenziamento in vitro ottenuti dalle ASC brune estratte dal tessuto adiposo che circonda il feocromocitoma e le ASC bianche estratte dal SAT dei medesimi pazienti è stata avanzata l'ipotesi che esistono differenti precursori cellulari con origini cellulari diverse per i due depositi (Di Franco et al., 2014).

Negli ultimi anni è stato scoperto come i microRNA (miRNA) associati ad alcuni fattori di trascrizione giocano un ruolo fondamentale nella determinazione del programma dell'adipogenesi bruna (Bushati e Cohen, 2007). Ad esempio, il miR 133a, un miRNA specifico del muscolo scheletrico, risulta assente negli adipociti bianchi ma è altamente espresso nei preadipociti bruni e negli adipociti bruni (Sun L. et al., 2011; Hilton et al., 2005). Inoltre, da studi più approfonditi è risultato che il miR 133a risulta espresso anche nel SAT e negli adipociti beige (Yin et al., 2013; Trajkovski et al., 2012). È stato visto che l'inibizione del miR 133a sia in vitro che in vivo produceva un incremento dei livelli di espressione di UCP-1 e di PRDM16. Al contrario, una sovraespressione di miR 133 inibiva completamente PRDM16, diminuiva significativamente i livelli di UCP-1 e di PPAR γ e aumentava i livelli dei fattori regolatori miogenici quali Myg e MyoD (Trajkovski et al., 2012). Inoltre, una delezione del miR 133 ha prodotto effetti a favore della brownizzazione del SAT in vivo e sul differenziamento del tessuto beige (Liu et al., 2013).

Un altro miRNA regolatore dell'adipogenesi bruna è il miR 455. Questo miRNA viene upregolato durante il differenziamento bruno, e risulta particolarmente

prodotto dopo trattamento di cellule con agonisti del PPAR γ quali rosiglitazone e norepinefrine (Hilton et al., 2005).

È ormai noto che il SAT rappresenta un fenotipo brite, ossia cellule morfologicamente simili agli adipociti bianchi ma che sono in grado di esprimere UCP-1 (Waldén et al., 2012; Seale et al., 2011). È stato recentemente proposto inoltre che il tessuto adiposo sopraclavicolare di soggetti adulti consiste di tessuto adiposo brite o beige (Wu et al., 2012; Sharp et al., 2012). Jespersen e colleghi hanno caratterizzato il BAT di questa regione anatomica, confrontando i livelli di espressione genica di alcuni marcatori del bruno e del beige con il WAT ottenuto da biopsie sottocutanee addominali degli stessi pazienti. Gli adipociti bruni di questi pazienti differenziati in vitro hanno risposto al trattamento con norepinefrine, upregolando PGC-1 α e UCP-1 e includendo l'espressione di altri marcatori del BAT quali miR 133, LHX8, ZIC1 e una downregolazione di marcatori del bianco (HOXC8 e HOXC9), suggerendo che il BAT nell'uomo origina dalla classica via di sviluppo del bruno (Jespersen et al., 2013). Tuttavia, il BAT esprimeva in parte anche alcuni marcatori del beige individuati dalla letteratura, quali TBX1 e TMEM26, suggerendo una coesistenza di cellule brune e beige all'interno del tessuto adiposo bruno umano.

Wu e collaboratori nel 2012 hanno dimostrato in modelli murini l'esistenza nel SAT di precursori cellulari che danno origine a cellule beige, capaci di esprimere abbondanti livelli di UCP-1 e di avviare un programma di espressione genica distinto da quello degli adipociti bianchi o bruni (Wu et al., 2012). Tali cellule sono presenti in elevate percentuali nel SAT rispetto al VAT. Quando gli animali venivano trattati con stimoli adrenergici o con il freddo in maniera cronica, gli

adipociti beige preesistenti (che apparivano uniloculari allo stato basale) andavano incontro a transdifferenziamento e browning, ed erano capaci di esprimere a livelli elevati UCP-1 e marcatori specifici del beige, quali CD137, TMEM26 e TBX1.

Nel 2013 è stata proposta una ipotetica origine di formazione dei precursori del beige. Pax3 è uno dei fattori di trascrizione precoci coinvolti nel processo di sviluppo embrionale e nella formazione di muscolo scheletrico, derma, cartilagine e tessuto adiposo. In esperimenti di lineage tracking, è stato dimostrato che cellule Pax3⁻ coltivate in vitro prelevate dal SAT di alcuni animali, dopo il terzo passaggio in coltura mostravano l'espressione dei tipici marcatori del beige quali CD137 e TMEM26. È stato quindi scoperto che precursori Pax3⁻ contenuti nel SAT sono i principali responsabili del processo di browning del SAT (Liu et al., 2013) mentre i precursori Pax3⁺ sono adibiti alla formazione di cellule brune, seguendo un lineage differente.

Il microambiente in cui risiedono i progenitori del beige viene considerato un fattore determinante per il transdifferenziamento (Rosenwald e Wolfrum, 2014). Parametri come la densità di vascolarizzazione, i tipi cellulari contenuti nella SVF, la composizione della matrice extra-cellulare, e l'innervazione locale è necessario considerarli. Il numero degli adipociti beige correla con le fibre noradrenergiche e topi Knock-out per i recettori adrenergici non sono capaci di effettuare il differenziamento beige durante la stimolazione da freddo, suggerendo che il microambiente contribuisce maggiormente alla formazione di adipociti bruni e beige (Jimenez et al., 2003; Vitali et al., 2012).

2. La Frazione Vasculo Stromale (SVF): composizione cellulare e principali marcatori dei predipociti (ADSC)

2.1 Il CD34

Il tessuto adiposo è una ricca fonte di cellule staminali multipotenti facilmente ottenibili mediante digestione enzimatica dalla frazione vasculo stromale (SVF) (Zimmerlin et al., 2010; Zuk et al., 2001). Sulla base del lavoro effettuato da Zimmerlin e collaboratori, sono state identificate tre popolazioni principali che risiedono nella SVF del tessuto adiposo insieme ad altre sottopopolazioni minori (fig.2): progenitori endoteliali $CD34^+/CD31^+$, progenitori subendoteliali di transizione e cellule stromali adipose avventizie $CD34^+/CD31^-$ (Zimmerlin et al., 2010).

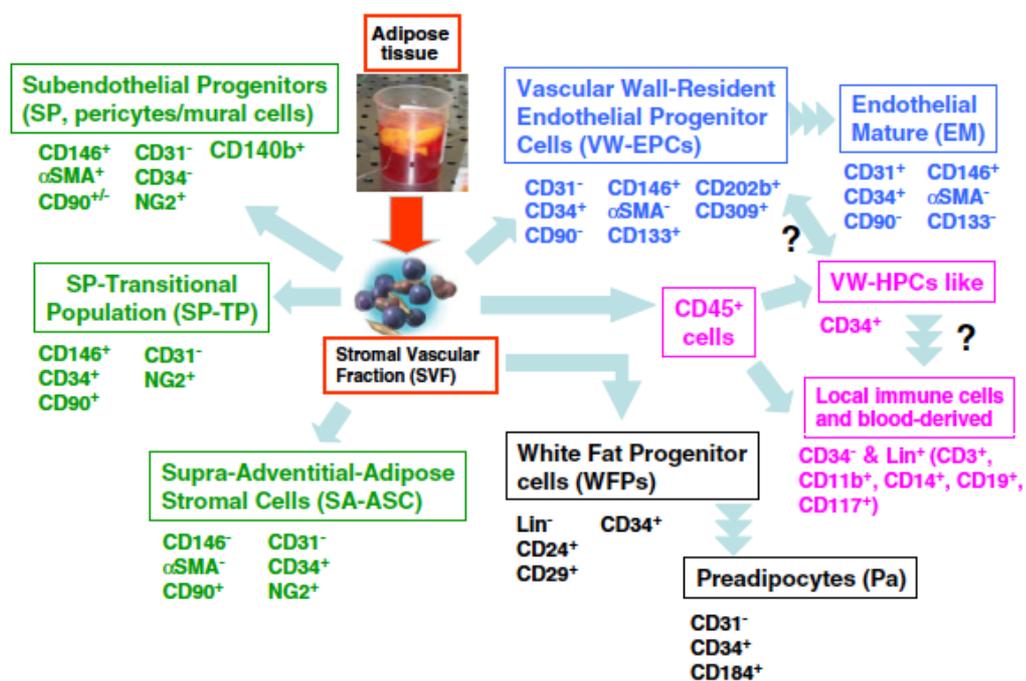


Fig.2: schema rappresentativo delle varie sottopopolazioni cellulari con i relativi marcatori di superficie espressi che compongono la SVF (Tallone et al., 2011).

Altri studi sul tessuto adiposo hanno rivelato che la componente staminale della SVF è composta principalmente da uno strato sopra-avventizio di cellule CD34⁺, caratterizzate da una multipotenza simile a quella delle cellule stromali mesenchimali (MSC) (Zimmerlin et al., 2010; Lin et al., 2008; Corselli et al., 2012). Questo strato sopra-avventizio circonda le arteriole e le venule le quali sono colonizzate anche da cellule perivascolari o periciti CD146⁺ sulle loro pareti (Zimmerlin et al., 2010; Zimmerlin et al., 2012).

In uno studio in cui veniva utilizzata la citometria di flusso multidimensionale per trovare una correlazione tra le popolazioni stromali adipose e le MSC, è risultato che vi era una espressione dei marcatori mesenchimali CD73, CD90 e CD105 su una piccola porzione di periciti CD146⁺ rispetto alle cellule sopra-avventizie (Zimmerlin et al., 2013).

Tuttavia, diversi studi sono concordi nell'affermare che le MSC umane adulte sono caratterizzate da una assenza dell'espressione del CD34 (Jiang et al., 2002; Pittenger e Martin, 2004).

Circa il 60 % - 80 % delle cellule della SVF del tessuto adiposo umano esprimono il CD34 (Planat-Benard et al., 2004; Scherberich et al., 2007), meglio conosciuto come il marcatore delle cellule staminali ematopoietiche (Civin et al., 1984).

La famiglia delle proteine CD34 è costituita da sialomucine transmembrana, le quali comprendono tre membri: CD34, podocalissina (Podxl) e endoglicano (Endgl). I membri di questa famiglia, seppur avendo una limitata identità di sequenza proteica, contengono domini e motifs che li distinguono come una subfamiglia distinta della più grande famiglia delle sialomucine transmembrana (Scherberich et al., 2013). Tutti e tre i membri contengono un peptide segnale N-terminale seguito da un dominio arricchito in Serina, Treonina e Prolina.

Noto per essere un marcatore delle cellule staminali ematopoietiche, il CD34 promuove la proliferazione e il blocco del differenziamento (Krause et al., 1996). Esperimenti effettuati su topi Knock-out per CD34 hanno dimostrato una resistenza alla formazione di tumori della pelle, avvalorando l'ipotesi della necessità di questo marcatore per la proliferazione cellulare (Trempey et al., 2007).

Suga e collaboratori hanno suggerito che l'espressione di CD34 nelle MSC del tessuto adiposo correla positivamente con le caratteristiche endoteliali e negativamente con quelle dei periciti (Suga et al., 2009).

Indagando i contributi delle diverse sottopopolazioni cellulari che compongono la SVF, è stato osservato che la popolazione di cellule CD34⁺/CD31⁻ contiene progenitori capaci di differenziare in senso osteogenico (Güven et al., 2011). Tali cellule sono anche in grado di differenziare in cellule endoteliali con capacità rigenerative in modelli animali sottoposti a ischemia (Madonna e De Caterina, 2008). Tuttavia, solo una combinazione delle popolazioni CD34⁺/CD31⁻ e CD34⁺/CD31⁺ è capace di fornire strutture vascolari in vitro (Güver et al., 2011). Sulla base di questi risultati, la popolazione CD34⁺/CD31⁺ identifica le cellule progenitrici endoteliali, mentre la popolazione CD34⁻/CD31⁺ identifica le cellule endoteliali mature (Zimmerlin et al., 2010). È necessario quindi perdere l'espressione del CD34 per avviare il programma di differenziamento endoteliale. Nel 2005, in esperimenti di cell sorting effettuati con biglie immunomagnetiche coniugate ad anticorpi diretti contro specifici marcatori di superficie cellulare (CD34, CD14 e CD31) è stato possibile separare ed ottenere le principali sottopopolazioni che compongono la SVF del tessuto adiposo umano. Dall'analisi FACS delle sottopopolazioni sortate è risultata una marcata downregolazione dei

marcatori CD31 e CD14 nelle cellule coltivate in vitro, mentre il CD34 veniva mantenuto solo stimolando le stesse in senso adipogenico. Infatti, gli agonisti del PPAR γ inducevano un riarrangiamento nella composizione cellulare della SVF che comportava una selezione delle cellule CD34⁺. La popolazione CD34⁺/CD31⁻ era in grado di esprimere i geni dell'adipogenesi e di effettuare attività metaboliche specifiche degli adipociti. In questo modo è stato affermato che la popolazione CD34⁺/CD31⁻ può essere identificata come la popolazione dei preadipociti, con caratteristiche distinte dalle cellule staminali mesenchimali ed ematopoietiche (Sengenès et al., 2005).

2.2 Pref-1

Dagli studi sulla composizione staminale della SVF, si è reso necessario individuare un marcatore da assegnare in maniera univoca alla composizione preadipocitaria. Il primo ipotetico marcatore ad essere identificato è stato il Preadipocyte factor-1 (Pref-1 o Dlk1) che potrebbe essere il miglior candidato in grado di identificare univocamente i preadipociti della SVF (Smas e Sul, 1993; Smas et al., 1997; Hudak e Sul, 2013).

Tale marcatore risulta essere espresso esclusivamente nel tessuto adiposo e nei preadipociti. Mediante esperimenti di marcatura delle cellule della SVF murina in grado di esprimere in maniera inducibile Pref-1, è stato dimostrato che le stesse differenziano in adipociti e rappresentano dei precursori adipocitari. Inoltre, il reclutamento delle cellule esprimenti Pref-1 sono risultate fondamentali nello sviluppo e formazione del tessuto adiposo. Gli stessi precursori vanno incontro a proliferazione durante l'espansione del tessuto adiposo in animali sottoposti ad

HFD, mentre una delezione di Pref-1 provoca un decremento dell'espansione del WAT negli adulti. Questo marcatore è stato quindi classificato come un marcatore precoce dei precursori adipocitari (Hudak et al., 2014). Nonostante sia stata avanzata l'ipotesi di un'origine endoteliale e/o pericitaria per i progenitori del tessuto adiposo, le cellule esprimenti Pref-1 non erano in grado di esprimere i marcatori endoteliali o pericitari.

Analisi su cellule umane uomo sono state condotte nel 2012 ad opera del gruppo di Mitterberger. Nello studio sono state isolate le ASC dalla SVF del tessuto adiposo sottocutaneo di alcuni pazienti femminili adulti. Le ASC risultavano positive per l'espressione di Pref-1 durante i passaggi precoci in vitro, e veniva downregolato durante il differenziamento adipogenico. Inoltre, esperimenti di silenziamento genico di Pref-1 mediante RNAi mostravano un significativo incremento dei fattori chiave dell'adipogenesi (PPAR γ e FABP4).

Pref-1 può essere quindi considerato un marcatore preadipocitario sia per la SVF di topo che di uomo, e agisce come un regolatore negativo dell'adipogenesi (Mitterberger et al., 2012).

2.3 Zfp423

Recentemente è stato individuato un altro marcatore preadipocitario, denominato Zinc-finger protein 423 (Zfp423), meglio noto per essere un coattivatore di SMAD. Cellule murine di preadipociti 3T3-L1 sono state subclonate mediante la tecnica delle diluizioni seriali, allo scopo di individuare i cloni maggiormente proliferativi e con il potenziale adipogenico più elevato. La maggior parte di questi cloni, dopo trattamento con stimoli adipogenici esprimeva a livelli elevati il

fattore di trascrizione Zfp423 rispetto ai fibroblasti non differenziati (Gupta et al., 2010). L'espressione di Zfp423 non era significativamente regolata durante il processo differenziativo adipogenico. Inoltre, è risultato che tale fattore di trascrizione risulta particolarmente espresso non solo negli adipociti maturi ma anche nella SVF del tessuto adiposo.

L'espressione ectopica di Zfp423 in cellule NIH 3T3 (poco propense al differenziamento adipogenico), ha prodotto adipociti maturi in grado di esprimere i marcatori molecolari adipogenici. Questi dati hanno quindi suggerito una regolazione del PPAR γ ad opera di Zfp423, rendendo i preadipociti non differenziati competenti ad attuare il programma adipogenico. Esperimenti di Knock-down di Zfp423 condotti in fibroblasti embrionici murini (MEF) hanno dimostrato che le cellule non erano in grado di differenziare in senso adipogenico rispetto ai controlli wild-type, confermando il suo ruolo nella regolazione di PPAR γ (Gupta et al., 2010).

Nel 2012, il gruppo di Gupta ha realizzato un modello murino che ha consentito di tracciare la presenza di preadipociti Zfp423⁺ in grado di esprimere la GFP. I risultati ottenuti hanno rivelato la presenza di preadipociti coesprimenti Zfp423 e GFP all'interno dei vasi sanguigni del tessuto adiposo di WAT e BAT, suggerendo una derivazione pericitaria dei preadipociti (Gupta et al., 2012). Inoltre, Zfp423 risultava costitutivamente espresso nelle cellule endoteliali del tessuto adiposo adulto. Questo dato ha quindi suggerito un contributo di cellule endoteliali Zfp423⁺ nella formazione delle cellule adipocitarie.

2.4 Altri marcatori

È dimostrato che le cellule che compongono la SVF *ex-vivo* esprimono alcuni marcatori delle MSC, quali il CD271, CD29, CD90, CD105, CD73 e CD13 (Bailey et al., 2010). In particolare, il CD271 viene considerato un marcatore altamente specifico delle MSC primitive all'interno del midollo osseo adulto, e identifica cellule con elevato potenziale clonogenico, proliferativo e differenziativo. Proteina transmembrana, il CD271 è espresso anche nei neuroni, cellule di Schwann, oligodendrociti, astrociti e melanociti. Attualmente, è un marcatore molto utilizzato per la selezione immunomagnetica di MSC estratte dal tessuto adiposo o dal midollo osseo (Quirici et al., 2010). Cellule MSC CD271⁺ mostrano il più elevato potenziale condrogenico confrontate con cellule CD271⁻ (Kuci et al., 2010; Hermida-Gomez et al., 2011).

Particolare attenzione merita il marcatore CD146. È una proteina di superficie appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline, ed è costitutivamente espressa nell'endotelio umano (Bardin et al., 1996). Da diversi studi è risultato che questo marcatore riveste un ruolo fondamentale nell'adesione delle cellule endoteliali e nell'angiogenesi (Shih I. M., 1999; Ouhtit et al., 2009). Oltre ad essere espresso dai periciti e dalle cellule endoteliali, è presente anche nei linfociti e melanociti (Wang e Yan, 2013). Inoltre, il CD146 è fortemente coinvolto ed espresso nelle cellule che promuovono la riparazione del tessuto cardiaco in seguito a danno ischemico (Chen et al., 2013). Recentemente, è stato dimostrato che le MSC CD146⁺, che rappresentano meno del 20% delle MSC derivate dal tessuto adiposo sono capaci di supportare esclusivamente le cellule staminali

ematopoietiche in vitro (Corselli et al., 2013). Alla luce dei dati che correlano l'espressione del CD146 con i periciti nei diversi tessuti dell'organismo umano, attualmente solo i periciti vengono considerati i progenitori delle MSC (Crisan et al., 2008). A supporto di questa teoria, in studi relativi al tessuto adiposo e la sua microvascolatura, è stata l'identificazione delle cellule stromali adipose avventizie che risiedevano attorno a piccoli vasi sanguigni del tessuto adiposo (Zimmerlin et al., 2010). Mediante l'utilizzo della citometria di flusso multiparametrica su cellule della SVF estratte dal tessuto adiposo, il gruppo di Zimmerlin ha proposto un ipotetico schema differenziativo dei periciti $CD146^+/CD34^-$ (fig.3): sottoponendo gli stessi a stimoli adipogenici, passando per stadi intermedi di espressione dei marcatori di superficie sono in grado di dare origine a cellule adipose sopra-avventizie $CD146^-/CD34^+$, le quali vanno incontro ad adipogenesi spontanea dopo il raggiungimento della confluenza in coltura e che presumibilmente danno origine ad adipociti maturi in vivo (Zimmerlin et al., 2012).

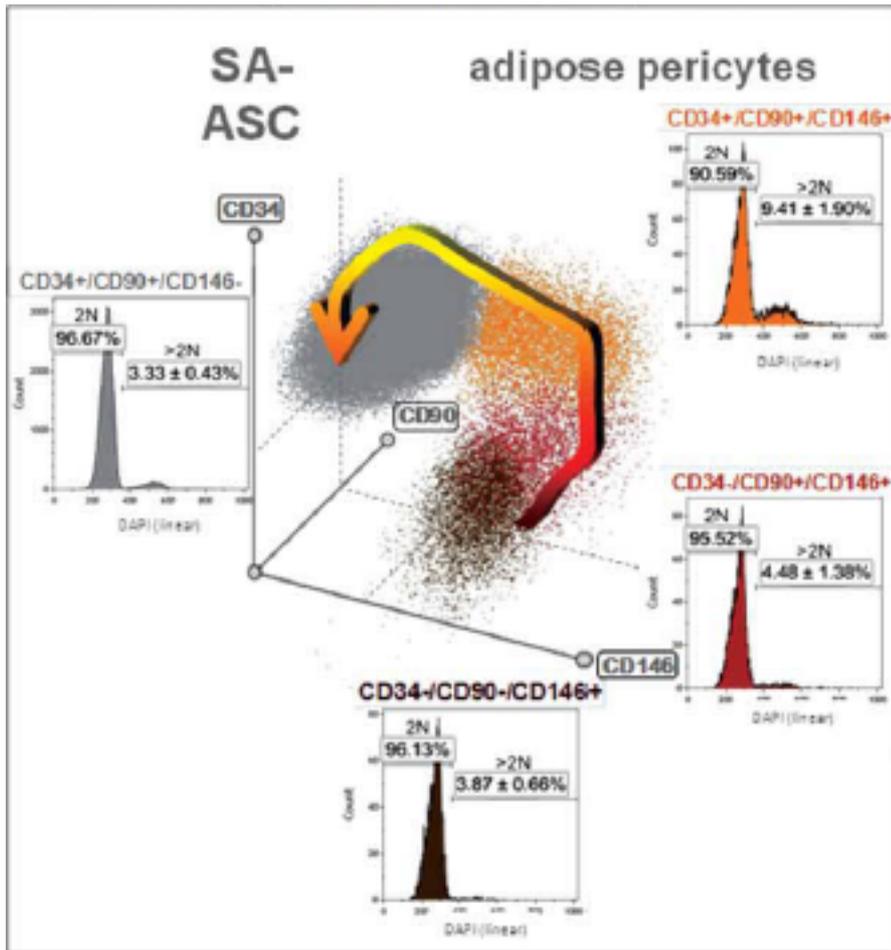


Fig.3: ipotetico schema differenziativo dei periciti $CD146^+/CD34^-$ della SVF del tessuto adiposo. Il risultato finale è la produzione di cellule adipose sopra-avventizie $CD146^+/CD34^+$, passando per lo stadio intermedio $CD146^+/CD34^+$ (Zimmerlin et al., 2012).

3. ADSC: un possibile ruolo nell'insorgenza dell'obesità?

L'accumulo eccessivo di tessuto adiposo bianco è una delle caratteristiche dell'obesità, che è clinicamente definita con l'indice di massa corporea (BMI = Kg/m^2) superiore a 30 (WHO, 2013). Divenuta una malattia che colpisce in larga parte l'Occidente, è spesso associata ad altre patologie quali diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari e alcune forme di cancro (WHO, 2013). L'insorgenza e lo sviluppo dell'obesità viene largamente attribuito a un eccessivo consumo di cibo e ad una ridotta attività fisica, con la conseguenza di generare progressivamente un accumulo di energia sotto forma di trigliceridi che vengono immagazzinati nel WAT (Spiegelman e Flier, 2001). Tuttavia, i meccanismi coinvolti nell'incremento della massa del tessuto adiposo sono ancora sconosciuti.

L'espansione del WAT all'interno dell'organismo avviene sia incrementando il contenuto lipidico negli adipociti maturi preesistenti, provocando un aumento delle dimensioni cellulari degli stessi (ipertrofia), sia aumentando il numero dei precursori preadipocitari all'interno del tessuto adiposo (iperplasia) (Joe et al., 2009; Wang A. Q. et al., 2013). In particolare, il WAT si accumula nel corpo nei depositi sottocutanei (SAT) e viscerali (VAT) (Cinti, 2005).

I progressi riportati nell'identificazione e isolamento dei precursori adipocitari consente oggi di studiare i meccanismi molecolari e cellulari che regolano il numero degli adipociti durante lo sviluppo e nell'obesità (Lee et al., 2012; Rodeheffer et al., 2008; Tang et al., 2008).

Durante il periodo postnatale, il SAT di bambini non obesi rimane relativamente in uno stato quiescente fino ai 10 anni di età, aumentando successivamente durante l'adolescenza (Knittle, 1978; Spalding et al., 2008). Negli animali adulti, in condizioni non obese il numero degli adipociti rimane relativamente costante, suggerendo che il plateau nel numero degli adipociti raggiunto alla fine dell'adolescenza rappresenta un numero prefissato in tali condizioni. Infatti, l'asportazione di SAT inguinale da ratti durante la fase adolescenziale provoca la compensazione del rimanente SAT, generando lo stesso numero di adipociti in questo deposito, riproducendo quanto accade negli animali di controllo (Faust et al., 1977). Da studi recenti è noto che gli adipociti maturi subiscono un costante turn-over, suggerendo come il mantenimento di un normale numero di adipociti sia regolato da un equilibrio tra adipogenesi e morte degli adipociti (Spalding et al., 2008; Wang A. Q. et al., 2013). Nell'obesità tale meccanismo potrebbe essere temporaneamente alterato, portando l'adipocita al fenomeno dell'iperplasia (Berry et al., 2014). Nel 2009, mediante un esperimento di incorporazione della bromodeossiridina (BrdU) nei depositi di SAT e VAT di modelli animali, è stato asserito che il SAT va incontro maggiormente ad una crescita iperplastica rispetto al VAT (Joe et al., 2009). Tuttavia, lo studio dell'iperplasia in risposta ad HFD con il modello di topo AdipoChaser sopra menzionato, ha dimostrato che viene formato un significativo numero di nuovi adipociti nel VAT dopo 8 settimane di HFD (Lee et al., 2012; Wang et al., 2013). Questi dati suggeriscono fortemente che, sebbene il SAT subisca un'incrementata proliferazione cellulare, il VAT contribuisce invece al fenomeno dell'adipogenesi nell'obesità indotta da dieta. (Berry et al., 2014).

Poiché i meccanismi cellulari e i diversi depositi dell'accumulo di WAT contribuiscono alla patogenesi dell'obesità, lo studio dell'espansione del WAT in vivo e del ruolo dei precursori cellulari in esso contenuti risulta quindi di fondamentale importanza per l'individuazione di nuovi target terapeutici per il trattamento dell'obesità, a favore non solo dei soggetti affetti da questa patologia e dalle complicazioni ad essa associate, ma anche per alleggerire l'onere economico che questa malattia comporta.

SCOPO DELLA TESI

Il mio lavoro svolto durante il Dottorato di Ricerca è stato finalizzato allo studio della caratterizzazione delle cellule staminali del tessuto adiposo in pazienti obesi, obesi diabetici e obesi dopo calo ponderale allo scopo di esaminare un possibile coinvolgimento dei precursori adipocitari nell'insorgenza e nello sviluppo dell'obesità e delle sue complicanze.

Il tessuto adiposo dei pazienti obesi generalmente si presenta con caratteristiche ipertrofiche e iperplastiche, ma tutt'oggi non è ancora ben stabilito il tipo di deposito adiposo che contribuisce maggiormente al fenomeno dell'iperplasia, e quali tipi di sottopopolazioni staminali siano principalmente coinvolte. Inoltre, non risultano chiari i meccanismi che nei pazienti post-obesi causano un nuovo aumento del peso in seguito a calo ponderale per trattamento chirurgico.

A tale scopo, all'interno del laboratorio di ricerca endocrino-metabolico è stato messo a punto un approccio di analisi citofluorimetrico multiparametrico volto ad analizzare e quantificare le varie sottopopolazioni staminali che compongono la SVF del tessuto adiposo dei depositi sottocutaneo addominale e viscerale, sfruttando l'espressione di specifici marcatori di superficie. È stato analizzato il potenziale adipogenico della SVF ex-vivo e durante i passaggi in vitro, e il contributo adipogenico di singole sottopopolazioni cellulari di interesse separate dalla SVF mediante sorting. Infine, è stato approfondito lo studio di specifici marcatori di staminalità analizzandone il profilo di espressione genica nelle cellule della SVF ex-vivo e in vitro, studiando inoltre i cambiamenti morfologici cui queste cellule andavano incontro in coltura.

MATERIALI E METODI

1. Reclutamento dei pazienti

I pazienti dai quali provengono le biopsie di tessuto adiposo vengono scelti tra i pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica, obesi e obesi diabetici di secondo grado e di terzo grado, con un BMI compreso tra 40 e 66 Kg/m². I pazienti obesi analizzati sono stati sottoposti ad interventi di chirurgia bariatrica, mentre i pazienti che hanno subito un calo ponderale in seguito a trattamento chirurgico vengono sottoposti ad un intervento di chirurgia plastica (addominoplastica) o a colecistectomia.

Da tali pazienti è possibile ottenere esclusivamente il tessuto adiposo sottocutaneo addominale (SAT) in caso di intervento di addominoplastica, mentre se i pazienti obesi vengono sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica è possibile ottenere entrambi i depositi tissutali (SAT e VAT). Alcuni dei dati clinici dei pazienti selezionati sono rappresentati in tabella 1.

	Fenotipo	Peso 1	Peso 2	Altezza	BMI 1	BMI 2	HOMA	TNF- α
	metabolico	(Kg)	(Kg)	(m)	(Kg/m ²)	(Kg/m ²)		(pg/ml)
N =7	Obesi	127 \pm 7.8	-	1.7 \pm 0.03	45 \pm 1.6	-	4.1 \pm 1.3	6.4 \pm 1.3
N =6	Obesi DM2	128 \pm 11	-	1.6 \pm 0.03	47 \pm 3.1	-	6.2 \pm 1.9	11 \pm 1
N =7	Post-obesi	122 \pm 19	90 \pm 18.3	1.6 \pm 0.06	45.6 \pm 3.8	33 \pm 4.4	-	-

Tab.1: parametri clinici utilizzati per la selezione dei pazienti obesi, obesi DM2 e post-obesi. I dati sono rappresentati come media \pm SEM. Peso 1 e BMI 1: peso e BMI registrati prima del trattamento chirurgico; peso 2 e BMI 2: peso e BMI registrati dopo trattamento chirurgico, in particolare per i post-obesi il valore indicato si riferisce al calo ponderale subito in seguito al trattamento.

La numerosità dei campioni è strettamente dipendente dalla disponibilità e dalla frequenza dei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico. Attualmente lo studio prevede anche l'inserimento di pazienti normopeso la cui scarsa reperibilità ha reso impossibile l'inclusione dei dati ottenuti dagli stessi, all'interno di questo lavoro di tesi. Tale studio è stato sottoposto ad analisi del Comitato Etico per la Sperimentazione dell'azienda ospedaliera di Padova e dell'Università degli studi di Padova, approvando l'esecuzione degli schemi sperimentali (prot. 2892P).

2. Processamento del tessuto adiposo ex vivo

Il tessuto adiposo estratto isolato ex-vivo dal paziente viene tagliato e frammentato in condizioni di sterilità, avendo cura di rimuovere i frammenti necrotici, i vasi e i nervi. Questa operazione consente una miglior digestione enzimatica che viene effettuata utilizzando collagenasi (Sigma) diluita in terreno DMEM F12 (1 mg/ml) (Gibco-Life Technologies), a 37°C per un'ora in agitazione. Dopo il trattamento, i frammenti di tessuto adiposo digeriti vengono centrifugati a 1300 rpm per 10 minuti, consentendo la separazione in: una frazione di adipociti maturi (MAF), e una frazione vasculo-stromale (SVF). Eliminato il surnatante, la FVS viene risospesa in DMEM F12 con 2% di FBS e filtrata attraverso un colino a maglia larga allo scopo di rimuovere le fibre più grossolane. La SVF viene centrifugata nuovamente e sottoposta all'azione del Lysis Buffer (1X) per 5 minuti, consentendo di rimuovere mediante lisi la maggior parte dei globuli rossi presenti nella sospensione cellulare. Successivamente viene bloccata l'azione del lisante tamponando con terreno al 2% di FBS, utilizzando il doppio del volume di Lysis Buffer usato per il trattamento. La sospensione cellulare viene

filtrata con filtri Cell Strainer da 100 μm (Falcon) e centrifugata. Infine, la FVS viene risospesa con un opportuno volume di DMEM F12 al 10% di FBS per effettuare la conta cellulare.

3. Composizione del Medium adipogenico (MAD)

Il Medium adipogenico (MAD) contiene diversi fattori utili alle cellule per avviare il programma di adipogenesi (i diversi componenti del MAD vengono diluiti in terreno DMEM F12):

Sostanza	Concentrazione finale
Hepes (Gibco)	1X
Penicillina/Streptomicina (Sigma)	1X
Transferrina (Biomedicals Inc.)	10 $\mu\text{g/ml}$
Biotina (Biomedicals Inc.)	33 μM
Pantotenato (Biomedicals Inc.)	17 μM
Insulina (Lilly)	66 nM
3,3', 5-Triiodo-L-thyronine (Sigma)	1 nM
Dexametasone (Sigma)	100 nM
Rosiglitazone (Avandia-Glaxo)	10 μM
IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (Sigma)	0.25 mM

Tab.2: elenco delle sostanze che compongono il Medium Adipogenico (MAD) utilizzato per il differenziamento delle cellule della SVF ex-vivo.

Tale terreno di induzione viene fornito alle cellule solo se raggiungono la giusta confluenza all'interno del pozzetto di coltura. In caso contrario, le cellule

potrebbero non differenziare o differenziare poco. Il cambio del terreno di induzione viene effettuato ogni 3 giorni, tuttavia solo per i primi 3 giorni di induzione viene fornito MAD con l'aggiunta di Rosiglitazone e IBMX.

4. Estrazione dell' RNA da cellule e da tessuto adiposo, trattamento con DNasi e retrotrascrizione

L'estrazione dell'RNA da cellule viene effettuata utilizzando il kit RNEasy (QIAGEN), mentre l'estrazione dell'RNA da tessuto adiposo congelato prevede una fase di disaggregazione tissutale utilizzando biglie di ferro e il disagregatore Tissue Lyser, un trattamento con QIAzol (QIAGEN) che contiene una miscela di fenolo e guanidina isotiocianato, e un successivo trattamento con cloroformio per consentire la separazione della soluzione in 3 fasi: una prima fase acquosa che contiene RNA, una seconda fase che contiene proteine e una terza fase che contiene componenti organiche. Una volta prelevata la fase acquosa, si procede con la normale estrazione dell'RNA descritta sopra. L'RNA estratto e eluito in H₂O viene quantificato con il Nanodrop.

Una volta prelevato il volume di RNA che si intende retrotrascrivere, si procede con la reazione di digestione enzimatica del DNA genomico. L'RNA viene quindi aggiunto a una miscela contenente Buffer di reazione (1X) e DNasi (Ambion), e incubato a 37°C per 30 minuti. Al termine della reazione viene aggiunto l'inattivatore enzimatico (il 10% del volume di reazione) lasciando agire per 2 minuti a temperatura ambiente. Infine si centrifuga a 13000 rpm e si preleva il surnatante (circa 28 µl) che viene sottoposto alla reazione di retrotrascrizione. L'RNA viene dapprima incubato con una miscela contenente Random Primers (37.5

ng/ml) (Promega) e H₂O, a 70°C per 5 minuti per permettere ai primer di appaiarsi al filamento di RNA (9.5 µl per campione). Successivamente viene aggiunta una seconda miscela che contiene Buffer di reazione (10X) (Promega), la trascrittasi inversa MLV (4 U/µl) (Promega), dNTPs (0.5 mM) (Promega) e inibitore di RNasi (0.4 U/µl) (Promega), per un volume di 12.5 µl di miscela di reazione per campione. La reazione di retrotrascrizione viene eseguita secondo un protocollo termico: 70°C per 5 minuti, 37°C per 60 minuti, 92°C per 5 minuti, 4°C all'infinito. Le sequenze delle varie coppie di primer utilizzate per gli esperimenti sono descritte in tabella 3:

Gene	Sequenza Forward	Sequenza Reverse
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
CD34	AGCACTAGCCTTGCAACATCTCCA	AAACTCCGCACAGCTGGAGGTCT
CD90	TGAAAACCTGCGGGCTCCGAG	GCGATGCTGATGGCCAGGTT
Zfp423	AGTGCCCCGGAAAAAGACA	TGCCTTCCTCAATCATGTGG

Tab.3: elenco delle sequenze di coppie di primer utilizzate per l'analisi dei profili di espressione genica in Real time PCR quantitativa.

5. Analisi dei livelli di mRNA mediante Real time PCR

I dosaggi genici vengono effettuati sfruttando la reazione di Real time PCR. Inizialmente viene creata una retta standard composta da 5 punti corrispondenti a un preciso quantitativo di cDNA totale. La retta inoltre viene creata a partire da un campione o da un pool di cDNA di campioni che meglio esprimono il gene di interesse. Ciascun campione diluito ad una specifica concentrazione, viene dosato effettuando l'analisi su un determinato quantitativo di cDNA. Il campione sottoposto a dosaggio viene aggiunto a una miscela di reazione composta da Sybr Green (Promega) e una miscela di primer specifici per il gene di interesse, diluiti ad una certa concentrazione variabile (100 nM - 300 nM) in base alla sequenza della coppia di primer. Il tutto costituisce un volume finale di 20 µl all'interno del pozzetto di reazione. Tale reazione viene condotta in un termociclatore (Applied BioSystem) secondo un protocollo termico:

50°C per 2 minuti, 95°C per 2 minuti in cui viene attivata la DNA Polimerasi, e un protocollo termico specifico in base al gene che viene dosato, con una temperatura di annealing specifica dei primer (95°C per 15 secondi in cui viene denaturato il cDNA e una specifica temperatura di annealing che consente l'appaiamento dei primer e la fase di elongazione). Tale protocollo viene ripetuto per 45 cicli. Infine si imposta il protocollo termico per la curva di dissociazione.

6. Analisi citofluorimetrica

200.000 cellule della FVS vengono utilizzate per l'analisi citofluorimetrica, utilizzando diverse combinazioni di anticorpi fluorescenti. Le cellule vengono risospese in FACS Buffer 1X freddo contenente il 2% di BSA utile per saturare i siti aspecifici presenti sulla superficie cellulare. Una volta centrifugate a 1300 rpm per 8 minuti si elimina il surnatante e si procede con l'aggiunta degli anticorpi fluorescenti (circa 10 µl di anticorpo per campione) (BD Pharmingen), suddivisi in base al fluorocromo (FITC, PerCP, APC e PE). Si lasciano agire al buio per 10 minuti. Le cellule trattate vengono risospese in FACS Buffer 1X per eliminare gli anticorpi in eccesso non legati sulla superficie cellulare, e centrifugate a 1300 rpm per 8 minuti. Infine vengono risospese in un volume adeguato di FACS Buffer 1X (circa 200 µl) per essere sottoposte ad analisi citofluorimetrica al citofluorimetro (Becton Dickinson Immunocytometry System).

Prima di procedere con la quantificazione delle varie sottopopolazioni cellulari che compongono la SVF, è stato necessario individuare le popolazioni linfomonocitarie, basandosi sulle loro dimensioni. Infatti, tali popolazioni hanno la caratteristica di possedere piccole dimensioni e un'elevata intensità di segnale fluorescente, e sono comprese in un range di Forward Scattering (FSC-H) compreso tra 300 e 400. I detriti cellulari derivanti da cellule linfo-monocitiche morte hanno invece un'elevata granulosità compresa tra 800 e 1000 di Side Scattering (SSC-H). Una volta escluse queste popolazioni cellulari, le analisi successive sono state concentrate sulle cellule che rientrano in un range tra 500 e 800 di FSC-H, il quale è incluso largamente nel gate morfologico R1 (fig. 1).

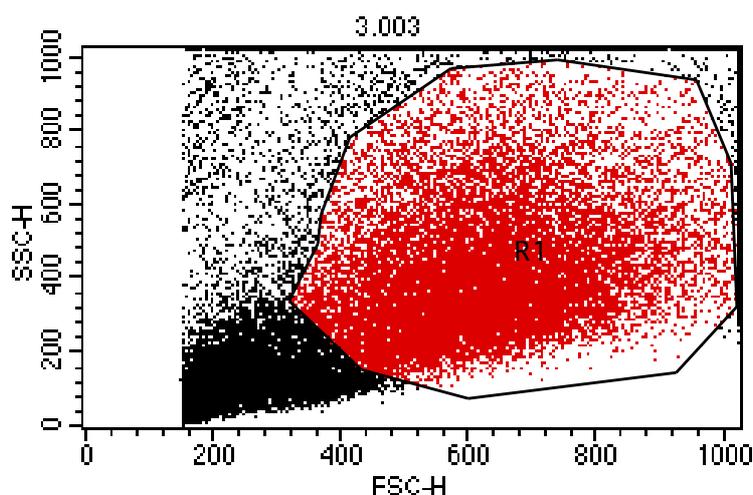


Fig.1: esempio di citogramma ottenuto dall'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni della SVF ex-vivo. Le cellule vengono analizzate in base ai parametri di FSC-H e di SSC-H, che dipendono dalle dimensioni e dalla granulosità delle cellule, rispettivamente. Le popolazioni linfomonocitarie sono comprese tra 300 e 400 di FSC-H, mentre i detriti cellulari risiedono in una zona compresa tra 800 e 1000 di SSC-H. Le cellule utili per lo studio risiedono in un range di 500-800 di FSC-H, incluso ampiamente all'interno del gate morfologico R1.

Per la selezione delle varie sottopopolazioni cellulari mediante la tecnica del sorting, circa 100 milioni di cellule della FVS vengono incubate mediante 60 ml di anticorpi anti CD146, anti-CD34 e anti-CD31 per 20 minuti al buio, agitando la miscela ogni 5 minuti. Alla fine dell'incubazione, le cellule vengono centrifugate a 1300 RPM per 8 minuti e risospese in 1 ml di FACS Buffer con 2% BSA freddo. Una volta terminato il sorting, le cellule vengono trattate con terreno F12 + 20% FBS per ripristinare la vitalità cellulare dopo lo stress meccanico subito dalle cellule all'interno del citofluorimetro.

7. Immunofluorescenza

Per l'analisi all'immunofluorescenza, 50.000 cellule della SVF ex-vivo e durante i passaggi in vitro vengono seminate su vetrini apposti, all'interno di piastre da 24 wells (Falcon). Le cellule vengono in seguito fissate utilizzando paraformaldeide (PFA) 4% per 20 minuti. Si eseguono successivamente due lavaggi in PBS 1X, seguita da una fase di permeabilizzazione delle membrane cellulari con Triton-X 100 0.3% (Sigma) in PBS per 15 minuti in ghiaccio e blocco dei siti aspecifici con BSA 1% (Sigma) in PBS per 1 ora a temperatura ambiente.

Gli anticorpi fluorescenti utilizzati per gli esperimenti sono: anti- β -tubulina 1:200 (Sigma), anti-actina 1:400 (Life Technologies), anti-vimentina 1:40 (Sigma), DAPI 1 μ g/ml (Sigma). Per tutti gli anticorpi utilizzati, la durata di incubazione è stata di 1 ora a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, le cellule fissate vengono lavate con PBS 1X e sono pronte per l'osservazione al microscopio a fluorescenza (Leica), utilizzando un ingrandimento di 40X con un obiettivo a immersione.

8. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test t di Student. I valori sono considerati statisticamente significativi considerando $P < 0.05$ o $P < 0.01$.

RISULTATI

1. Analisi del pattern di espressione dei marcatori CD45 e CD31 nelle cellule della SVF

Per la caratterizzazione dei principali marcatori delle staminali mesenchimali espressi sulla superficie delle cellule della SVF, è stato adottato un approccio citofluorimetrico multiparametrico. La tecnica, mediante l'utilizzo di diversi anticorpi fluorescenti a quattro lunghezze d'onda diverse e diretti contro specifici marcatori di superficie, consente di quantificare la presenza di tali marcatori associati a determinate sottopopolazioni cellulari della SVF del tessuto adiposo (tab.1).

	FITC	PE	PerCP	APC
1	-	-	-	-
2	Mouse IgG1κ	Mouse IgG1κ	Mouse IgG1κ	Mouse IgG1κ
3	CD45	CD31	CD34	-
4	CD31	CD13	CD34	CD29
5	CD31	CD90	CD34	CD73
6	CD31	CD146	CD34	CD271

Tab.1: la tabella illustra le diverse combinazioni di anticorpi fluorescenti utilizzati per la marcatura delle cellule della SVF ex-vivo. Il campione 1 non marcato è utile per individuare l'eventuale autofluorescenza emanata dalle cellule; il campione 2 trattato con l'anticorpo Mouse IgG1κ serve ad eliminare il background di segnale prodotto dalle cellule marcate nelle quattro lunghezze d'onda di lettura; dal campione 3 al campione 6 viene analizzata la co-espressione del CD34 con altri marcatori di superficie delle staminali mesenchimali e con il marcatore endoteliale CD31.

Le analisi sono state condotte sulla SVF ex-vivo di pazienti obesi (N=7), obesi con diabete mellito di tipo 2 (DM2) (N=6) e post-obesi sottoposti ad addominoplastica in seguito a calo ponderale per trattamento chirurgico.

Il primo obiettivo, all'interno del gate morfologico R1 è stato quello di quantificare le sottopopolazioni che co-esprimessero o meno il CD34 con il marcatore linfocitario CD45 e con il marcatore endoteliale CD31, nei depositi adiposi sottocutaneo e viscerale (fig.1). In questo modo, è stato possibile escludere le sottopopolazioni CD45⁺ non utili ai fini delle nostre analisi e che sono contaminanti del tessuto adiposo.

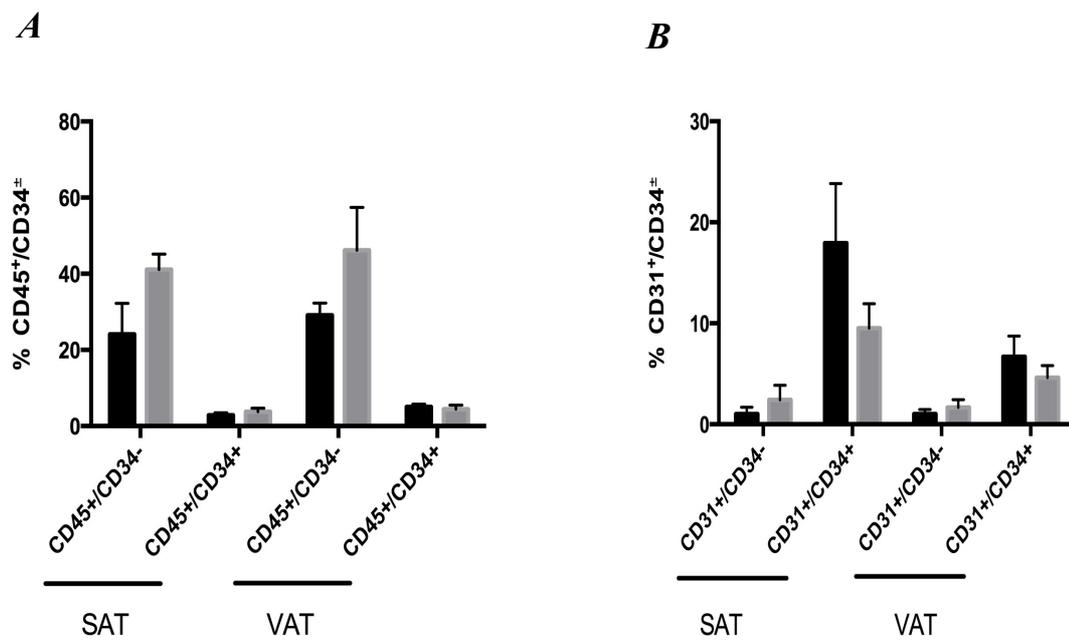


Fig.1: analisi citofluorimetrica delle popolazioni CD45+/CD34± (A) e CD31+/CD34± (B) nella SVF estratta da depositi di SAT e VAT all'interno del gate morfologico R1. I dati sono rappresentati come media ± SEM; le barre in nero rappresentano i pazienti obesi, le barre in grigio i pazienti obesi con DM2.

L'analisi citofluorimetrica ha rilevato che la percentuale di cellule CD45⁺/CD34⁻ in entrambi i depositi tissutali rappresentano circa il 30% della SVF nei pazienti obesi (24.1% ± 6.6% SAT vs 29.1% ± 2.7% VAT) e circa il 45% nei pazienti obesi con DM2 (41.1% ± 3.1% SAT vs 46.6% ± 8.4% VAT), mentre la popolazione CD45⁺/CD34⁺ è contenuta in percentuali inferiori al 5% in entrambe le categorie di pazienti e depositi. La maggior parte delle cellule CD31⁺ invece co-esprime il CD34 in quantità superiori nel SAT rispetto al VAT delle due categorie di pazienti presi in esame (18% ± 5.4% SAT obesi vs 6.7% ± 2.2 % VAT obesi; 9.5% ± 2.2% SAT obesi DM2 vs 4.6% ± 1.2% VAT obesi DM2). La popolazione CD31⁺/CD34⁻ invece è presente a livelli molto bassi nei depositi analizzati degli obesi e degli obesi con DM2 (percentuali inferiori al 2%).

2. La popolazione di preadipociti CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻ è presente in quantità differenti nei due diversi depositi di tessuto adiposo

Dall'esclusione delle cellule linfocitarie CD45⁺ è stato possibile selezionare una regione di Forward Scattering (FSC-H) compresa tra 500 e 800, comprendente ampiamente il gate morfologico R1. All'interno di tale regione si sono focalizzate tutte le quantificazioni delle varie sottopopolazioni cellulari di nostro interesse.

Particolare attenzione è stata rivolta alla popolazione CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻ identificata dalla letteratura come la popolazione dei preadipociti. Allo scopo è stata analizzata la SVF estratta da SAT e VAT di pazienti obesi (N=7) e obesi DM2 (N=6), con il fine di mettere in evidenza eventuali differenze in termini

quantitativi di questa sottopopolazione cellulare nei due depositi di tessuto adiposo (fig.2).

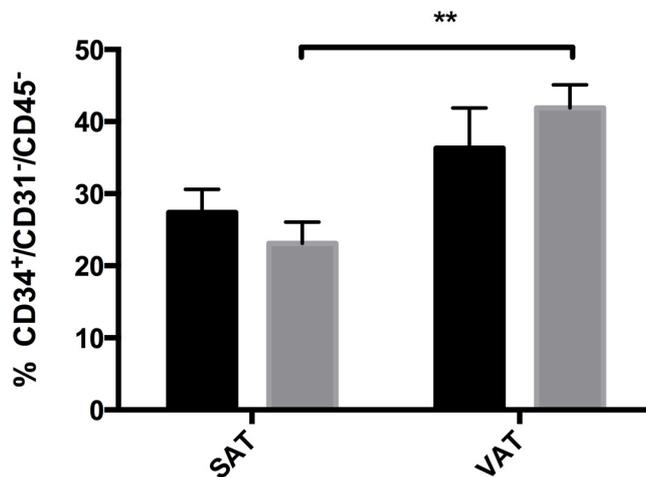


Fig.2: analisi della percentuale di cellule CD34+/CD31-/CD45- contenute nella SVF di SAT e VAT dei pazienti obesi (barre nere) e obesi DM2 (barre grigie). I dati sono rappresentati come media \pm SEM. ** = $P < 0.01$.

Dal grafico si può osservare una maggior presenza delle cellule CD34+/CD31-/CD45- nel tessuto adiposo viscerale rispetto al tessuto sottocutaneo, sia nei pazienti obesi (36.3% \pm 5.6% VAT vs 27.4% \pm 3.2% SAT) che nei pazienti obesi DM2 (41.9% \pm 3.2% VAT vs 23.1% \pm 2.9% SAT), in questo caso con differenze più elevate e statisticamente significative ($P < 0.01$).

Interessanti e sorprendenti sono i risultati ottenuti confrontando la SVF del solo tessuto adiposo sottocutaneo negli obesi, obesi DM2 e post-obesi sottoposti ad addominoplastica (fig.3).

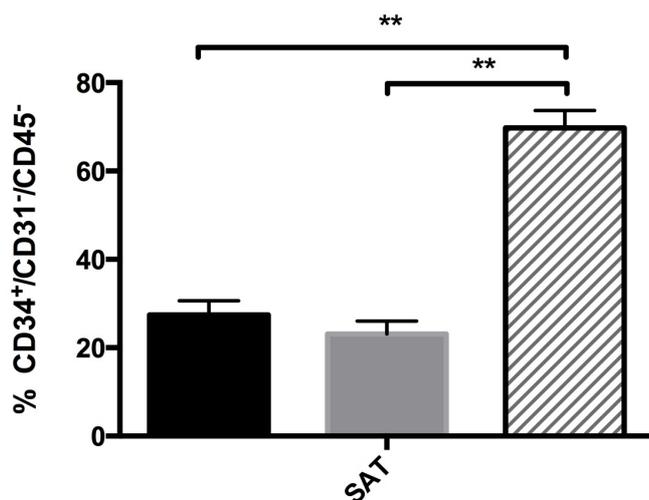


Fig.3: analisi della percentuale di cellule CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻ contenute nella SVF di SAT nei pazienti obesi (barra nera), obesi DM2 (barra grigia) e post-obesi (barra tratteggiata). I dati sono rappresentati come media ± SEM. ** = P < 0.01.

La SVF contenuta nel SAT dei post-obesi possiede la più elevata percentuale di preadipociti CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻ (circa il 70%) significativamente maggiore (P < 0.01) rispetto alle percentuali della stessa sottopopolazione di cellule contenuta nel SAT degli obesi e degli obesi DM2 (69.8% ± 3.9% post-obesi vs 27.4% ± 3.2% obesi vs 23.1% ± 2.9% obesi DM2).

Analogamente a questa popolazione e all'interno dello stesso gate morfologico R1, sono state quantificate le popolazioni comprendenti i precursori endoteliali contenuti anch'essi nella SVF dei depositi adiposi presi in esame nelle stesse categorie di pazienti. Le analisi successive sono state quindi effettuate sulle popolazioni CD34⁺/CD31⁺/CD45⁻ identificate come una popolazione di precursori endoteliali (fig.4).

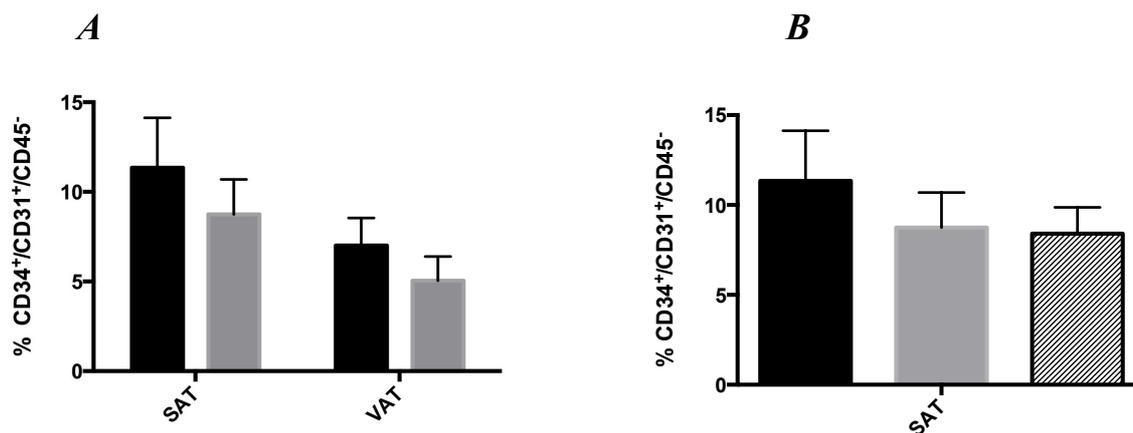


Fig.4 : analisi citofluorimetrica delle popolazioni CD34⁺/CD31⁺/CD45⁻ nella SVF da SAT e VAT di pazienti obesi e obesi DM2 (A) e CD34⁺/CD31⁺/CD45⁻ nella SVF contenuta nel SAT dei pazienti obesi, obesi DM2 e post-obesi (B) all'interno del gate morfologico R1. I dati sono rappresentati come media \pm SEM; le barre in nero rappresentano i pazienti obesi, le barre in grigio i pazienti obesi con DM2 e la barra tratteggiata i post-obesi.

L'andamento delle cellule CD34⁺/CD31⁺/CD45⁻ segue un profilo contrario a quello ottenuto con la popolazione dei preadipociti CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻. Infatti, vi è un quantitativo maggiore di precursori endoteliali nel SAT dei pazienti obesi e obesi DM2 rispetto al VAT degli stessi, soprattutto considerando il SAT degli obesi (11.4% \pm 2.8% SAT vs 7% \pm 2.5% VAT obesi; 8.7% \pm 1.9% SAT vs 5% \pm 1.9% VAT obesi DM2). Confrontando il solo tessuto adiposo sottocutaneo, vi è una maggior presenza di precursori endoteliali nella SVF contenuta nel SAT degli obesi rispetto alla SVF nel SAT degli obesi DM2 e dei post-obesi (11.4% \pm 2.8%; 8.7% \pm 1.9%; 8.4% \pm 1.5%). In generale, il contenuto dei precursori endoteliali risulta comunque più basso rispetto alla popolazione preadipocitaria.

3. CD271 e gli altri marcatori delle cellule staminali mesenchimali della SVF

La SVF del tessuto adiposo contiene diverse popolazioni mesenchimali di cellule. L'analisi citofluorimetrica volta a quantificare le popolazioni preadipocitarie nel tessuto adiposo è stata estesa ad altri marcatori delle staminali mesenchimali, focalizzando l'attenzione sulla co-espressione del CD34 con i marcatori mesenchimali CD271, CD90 e CD73 (fig. 5).

Le tipologie di tessuto adiposo e le categorie di pazienti analizzati sono le stesse delle precedenti analisi.

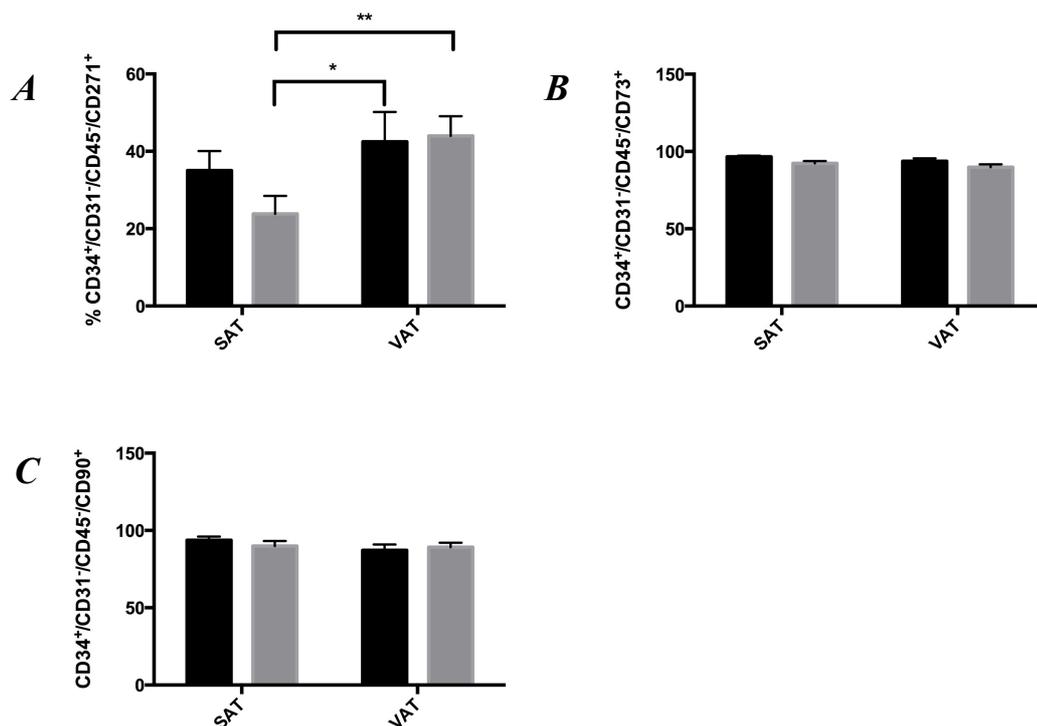


Fig.5: analisi citofluorimetrica delle popolazioni CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD271⁺ (A), CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD73⁺ (B) e CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD90⁺ (C) nella SVF da SAT e VAT di pazienti obesi (barre nere) e obesi DM2 (barre grigie) all'interno del gate morfologico R1. I dati sono rappresentati come media \pm SEM; * = P < 0.05; ** = P < 0.01.

I dati ottenuti dimostrano che le cellule CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD73⁺ (fig.5B) e CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD90⁺ (fig. 5C) sono presenti ad alte percentuali nella SVF sia da SAT e sia da VAT, negli obesi e negli obesi DM2. Non si osservano inoltre differenze significative tra i due depositi analizzati, nelle cellule CD90⁺ (93.7% ± 2.2% SAT obesi vs 87.2% ± 3.4% VAT obesi; 89.9% ± 3.1% SAT obesi DM2 vs 89.2% ± 2.9% VAT obesi DM2) e in quelle CD73⁺ (96.6% ± 0.6% SAT obesi vs 93.7% ± 1.7% VAT obesi; 92.3% ± 1.4% SAT obesi DM2 vs 89.8% ± 1.9% VAT obesi DM2). Anche i marcatori mesenchimali CD13 e CD29 risultano co-espressi con il CD34 ad elevate percentuali nella SVF, senza particolari differenze tra i depositi e i gruppi di pazienti (dati non mostrati).

Il marcatore CD271, co-espresso con il CD34 invece è significativamente presente in quantità maggiori nel VAT rispetto al SAT, in entrambi i gruppi di pazienti presi in esame (fig. 5A). Infatti, la popolazione CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD271⁺ rappresenta circa il 35% nel SAT degli obesi, contro il 42.5% nel VAT degli stessi pazienti (35% ± 5.1% SAT vs 42.5% ± 7.2% VAT). Nel VAT degli obesi DM2 le percentuali di cellule CD271⁺ sono simili a quelle ottenute nel VAT degli obesi, ma sono presenti in quantità inferiori nel SAT rispetto allo stesso deposito dei pazienti obesi (23.8% ± 4.7% SAT vs 44% ± 5.1% VAT).

4. CD146: analisi citofluorimetrica di un ipotetico marcatore universale di staminalità

Nella caratterizzazione citofluorimetrica delle cellule della SVF è stata valutata anche la co-espressione del CD34 con il CD146, considerato come un marcatore universale della staminalità oltre ad essere un marcatore dei periciti.

L'analisi delle percentuali delle diverse sottopopolazioni che esprimono il CD146 è stata condotta sugli stessi gruppi di pazienti e depositi adiposi delle precedenti analisi (fig. 6).

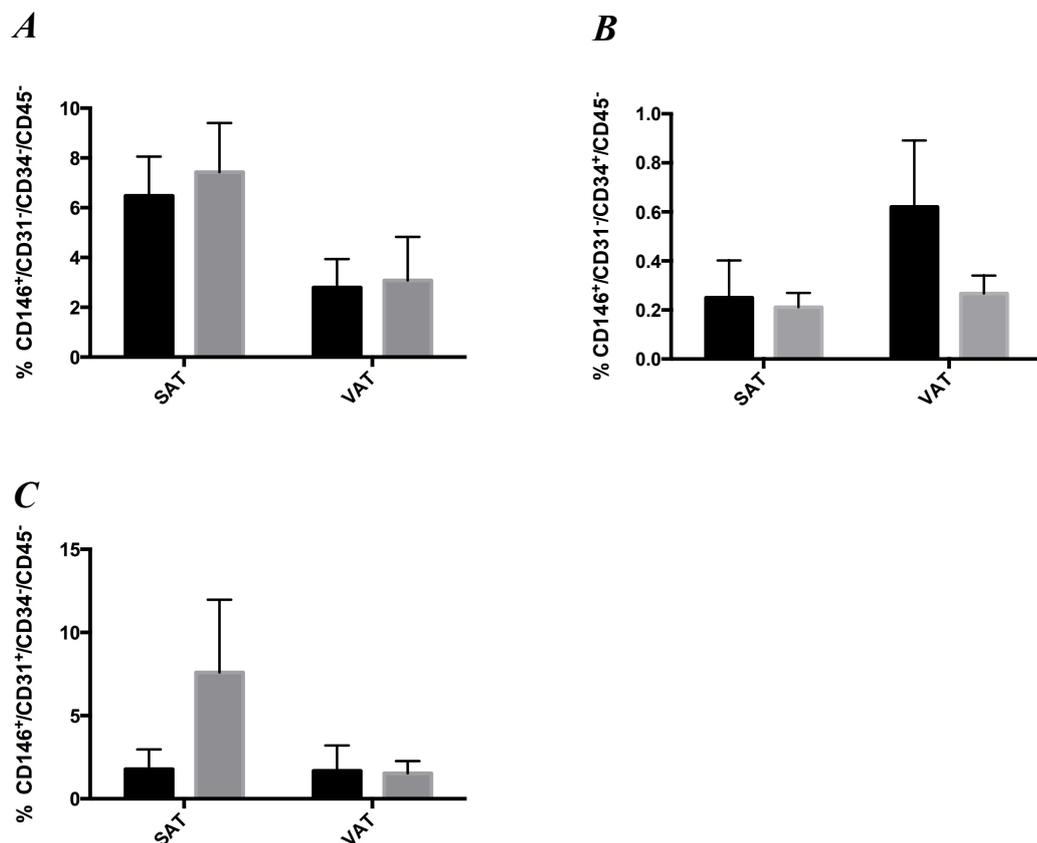


Fig.6: analisi citofluorimetrica delle popolazioni CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻/CD45⁻ (A), CD146⁺/CD31⁻/CD34⁺/CD45⁻ (B) e CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻/CD45⁻ (C) nella SVF da SAT e VAT di pazienti obesi (barre nere) e obesi DM2 (barre grigie) all'interno del gate morfologico R1.

I dati sono rappresentati come media \pm SEM.

In generale, le cellule CD146⁺ sono presenti nella SVF del tessuto adiposo con percentuali inferiori al 10%. In particolare, la popolazione CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻/CD45⁻ (fig. 6A) risulta maggiormente presente nella SVF del SAT degli obesi e degli obesi DM2 rispetto ai loro VAT (6.5% ± 1.6% SAT obesi vs 2.8% ± 1.1% VAT obesi; 7.4% ± 2% SAT obesi DM2 vs 3.1% ± 1.6% VAT obesi DM2). La popolazione CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻/CD45⁻ (fig. 6C) è contenuta a livelli paragonabili negli obesi in entrambi i depositi tissutali, ad eccezione degli obesi DM2 che presentano quantità superiori di tale sottopopolazione nel SAT rispetto al VAT (7.6% ± 4.4% SAT vs 1.5% ± 0.7% VAT).

La popolazione meno rappresentata all'interno della SVF è la CD146⁺/CD31⁻/CD34⁺/CD45⁻ (fig. 6B): è contenuta in meno dell'1% della SVF totale in entrambi i tessuti adiposi dei due gruppi di pazienti analizzati e risulta presente maggiormente all'interno del VAT degli obesi (0.3% ± 0.2% SAT vs 0.6% ± 0.3% VAT).

Le stesse sottopopolazioni quantificate nei rispettivi SAT sono state confrontate con il SAT dei post-obesi (N=7) (fig.7).

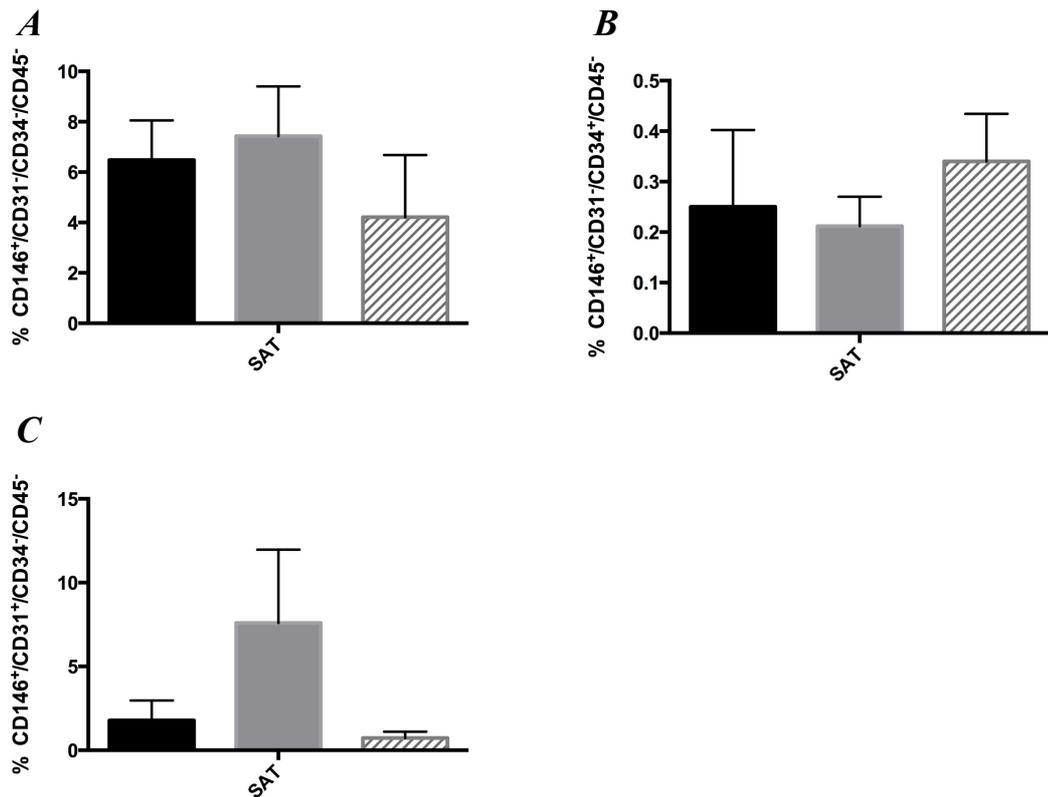


Fig.7: analisi citofluorimetrica delle popolazioni CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻/CD45⁻ (A), CD146⁺/CD31⁻/CD34⁺/CD45⁻ (B) e CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻/CD45⁻ (C) nella SVF da SAT di pazienti obesi (barre nere), obesi DM2 (barre grigie) e post-obesi (barre tratteggiate) all'interno del gate morfologico R1. I dati sono rappresentati come media ± SEM.

In questo caso, il SAT dei post-obesi contiene meno cellule CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻/CD45⁻ rispetto al SAT delle altre due categorie di pazienti (fig. 7A) (6.5% ± 1.6% obesi; 7.4% ± 2% obesi DM2; 4.2% ± 2.5% post-obesi). Invece, la popolazione CD146⁺/CD31⁻/CD34⁺/CD45⁻ è lievemente presente di più nel SAT dei post-obesi (fig. 7B) rispetto agli altri gruppi, e anche in questa categoria di pazienti si conferma essere la popolazione meno presente nella SVF (0.3% ± 0.2% obesi; 0.2% ± 0.1% obesi DM2; 0.3% ± 0.1% post-obesi). Infine, la popolazione CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻/CD45⁻ si conferma essere maggiormente presente

all'interno del SAT degli obesi DM2 (fig. 7C) rispetto agli obesi e post-obesi ($7.6\% \pm 4.4\%$).

5. Le cellule della SVF riducono progressivamente il potenziale adipogenico in vitro e l'espressione del CD34

Parallelamente all'analisi citofluorimetrica, è stato analizzato il potenziale adipogenico della SVF in vitro. Le cellule utili per gli esperimenti sono state prelevate dal tessuto adiposo sottocutaneo di pazienti sottoposti ad addominoplastica. Il tessuto così recuperato consente di ottenere una resa cellulare elevata.

Una volta seminate, le cellule vengono indotte con opportuni stimoli adipogenici per 10 giorni di trattamento, portando alla formazione di adipociti maturi multiloculari (fig. 8).

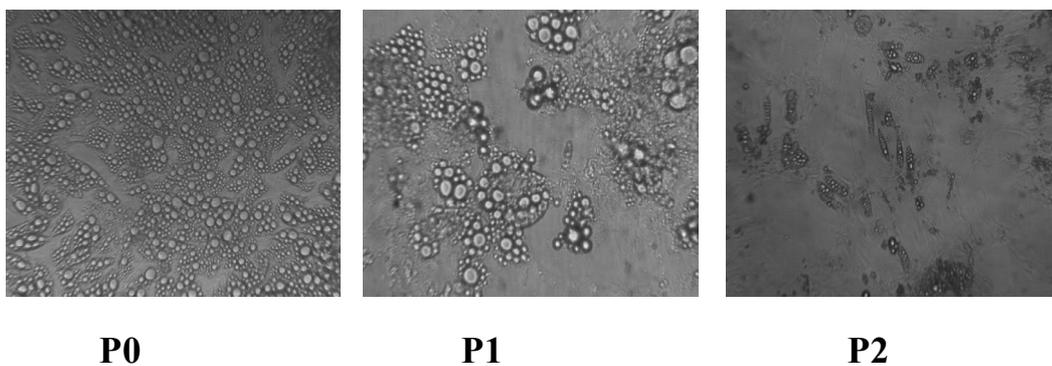


Fig. 8: rappresentazione del potenziale adipogenico delle cellule della SVF da tessuto adiposo sottocutaneo differenziata per 10 giorni in vitro. tale esperimento è stato ripetuto per N=5 pazienti. Immagini scattate al decimo giorno di differenziamento con un microscopio ottico, obiettivo 10X. Legenda: P0= SVF ex-vivo; P1 e P2 = SVF differenziata nei passaggi in coltura.

La SVF presenta chiaramente il più alto potenziale adipogenico in P0 (ex-vivo). Tale potenziale viene fortemente ridotto immediatamente in P1 e in P2. Durante i passaggi in vitro si riduce non solo la resa di adipociti maturi ottenuti, ma anche la dimensione dei vacuoli lipidici.

Interessanti sono i risultati ottenuti dalla valutazione dei livelli di espressione del CD34, di Zfp423 e del CD90 nella SVF ex-vivo e durante i passaggi in vitro (fig. 9).

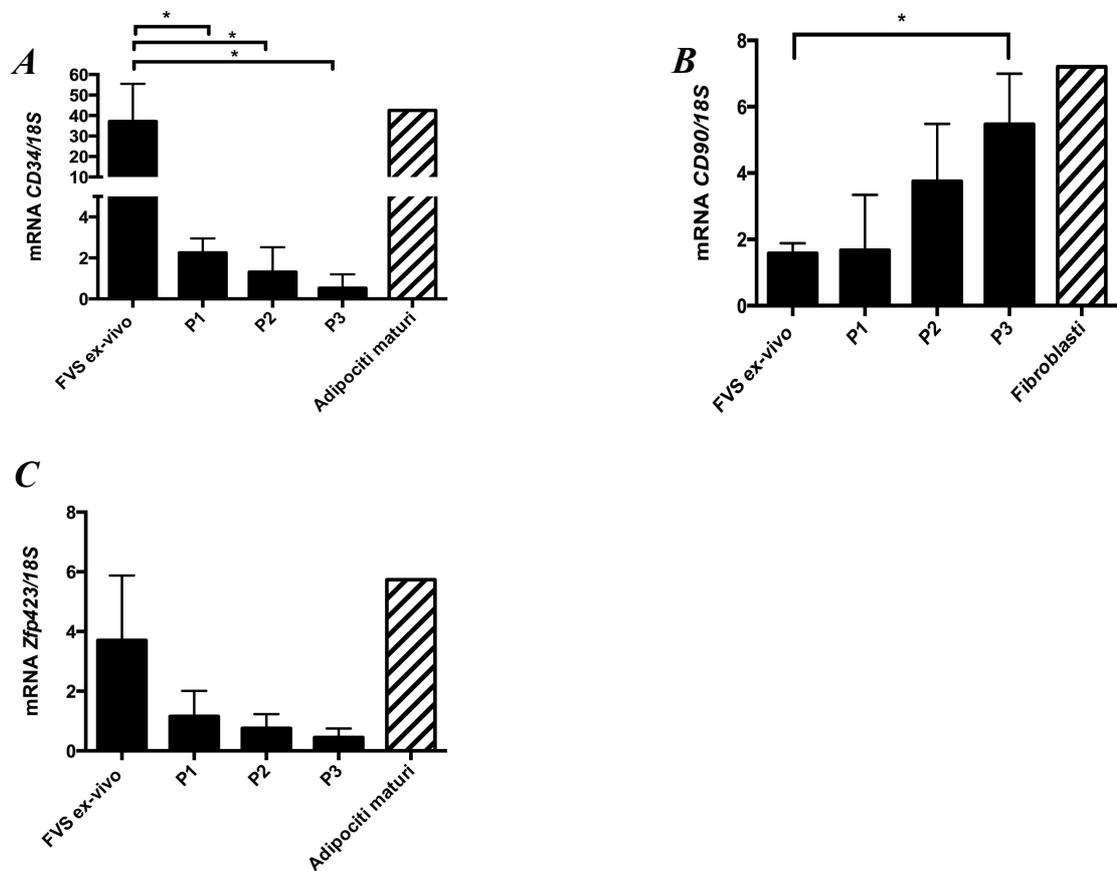


Fig.9: valutazione dei profili di espressione genica di CD34 (A), CD90 (B) e Zfp423 (C) ottenuta mediante RT-PCR quantitativa nella SVF ex-vivo e nei passaggi in vitro da P1 a P3 (barre nere). I controlli positivi sono rappresentati dalle barre tratteggiate. I valori sono rappresentati come contenuto di mRNA espresso in unità arbitrarie (AU) \pm SD e normalizzati per il contenuto in rRNA 18S. I dati sono stati ottenuti da un gruppo di pazienti N=5; * = P<0.05.

I dati di espressione del CD34 appaiono subito correlare con la perdita della capacità adipogenica osservata in vitro con il microscopio ottico: la SVF ex-vivo presenta infatti il più elevato profilo di espressione di questo marcatore paragonato ai livelli del controllo positivo rappresentato dagli adipociti maturi, e il più alto potenziale adipogenico in vitro. L'espressione poi cala drasticamente già dopo il primo passaggio in coltura (P1) e successivamente durante gli altri passaggi in vitro (fig. 9A). Analogamente al CD34 si comporta il fattore Zfp423 identificato come un marcatore dei preadipociti nel topo, tuttavia le differenze non sono significative (fig. 9C). Il CD90 invece presenta un profilo di espressione opposto a quello mostrato con il CD34: risulta poco espresso nella SVF ex-vivo e i suoi livelli aumentano progressivamente lungo i passaggi in coltura (fig. 9B), fino a raggiungere livelli paragonabili a quelli dei fibroblasti utilizzati come controllo positivo. Il CD90 infatti non è solo un marcatore delle cellule staminali mesenchimali, ma è anche un marcatore di fibrosi e dei fibroblasti.

Per cercare di comprendere meglio i meccanismi che contraddistinguono i cambiamenti cellulari osservati in vitro durante i passaggi in coltura, sono state analizzate in immunofluorescenza alcune proteine citoscheletriche nella SVF ex-vivo e nei passaggi in vitro (fig. 10).

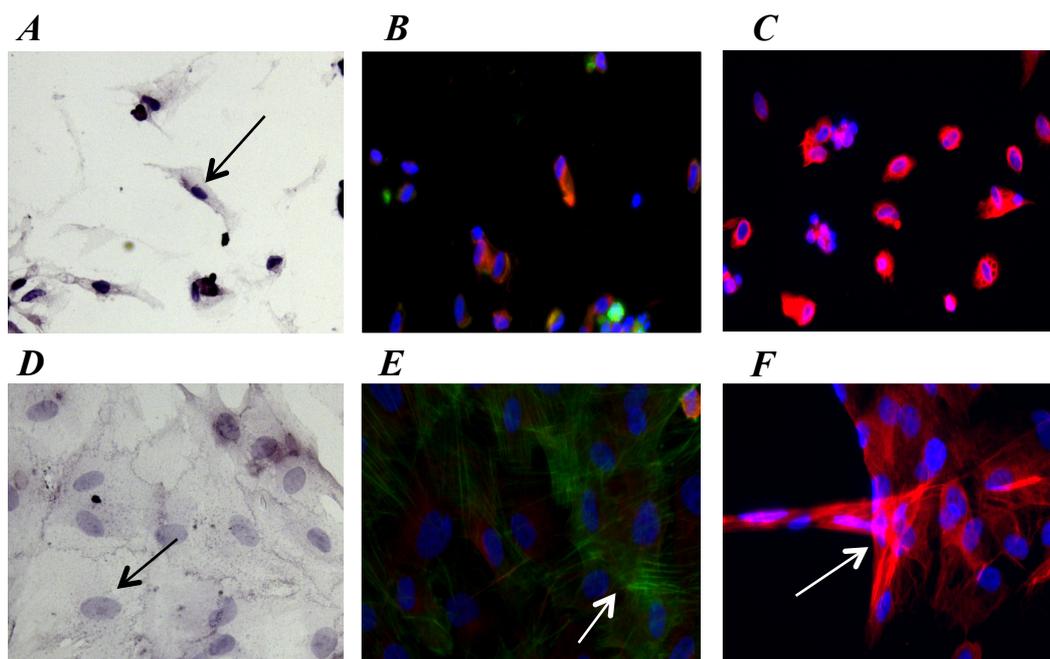


Fig.10: analisi in immunofluorescenza della SVF ex-vivo (A-B-C) e in vitro (D-E-F). Legenda: A-D: staining per ematossilina-eosina; B-E: staining per F-actina (in verde), β -tubulina (in rosso) e nucleo (in blu, DAPI); C-F: staining per vimentina (in rosso) e nucleo (in blu, DAPI). Le immagini sono in scala di 50 μ m.

È stato osservato un aumento nelle dimensioni dei nuclei e delle superfici cellulari, probabilmente accompagnati da un aumento dell'adesione cellulare nella SVF in coltura (fig.10D) rispetto alla SVF ex-vivo (fig. 10A). Inoltre, si verifica un incremento della presenza di proteine citoscheletriche come la F-actina e la vimentina che accade durante i passaggi in vitro (fig. 10E e 10F).

6. Valutazione del contributo adipogenico di singole sottopopolazioni cellulari della SVF

La SVF contiene una popolazione eterogenea di cellule staminali adulte. Ciascuna di queste sottopopolazioni fornisce un contributo quantitativamente diverso in termini adipogenici. Sfruttando la citofluorimetria e l'utilizzo di tre anticorpi fluorescenti diretti contro il CD34, CD31 e il CD146 è stato possibile effettuare la separazione (sorting) di quattro sottopopolazioni cellulari di interesse identificate dalla letteratura. In questo modo abbiamo ottenuto cellule: CD34⁺/CD31⁻ (preadipociti), CD34⁺/CD31⁺ (precursori endoteliali), CD34⁻/CD31⁺ (cellule endoteliali mature), CD146⁺/CD34⁻/CD31⁻ (periciti). Le cellule così "sortate" sono state trattate con stimoli adipogenici per 10 giorni, al termine dei quali sono state scattate fotografie al microscopio ottico (fig. 11).

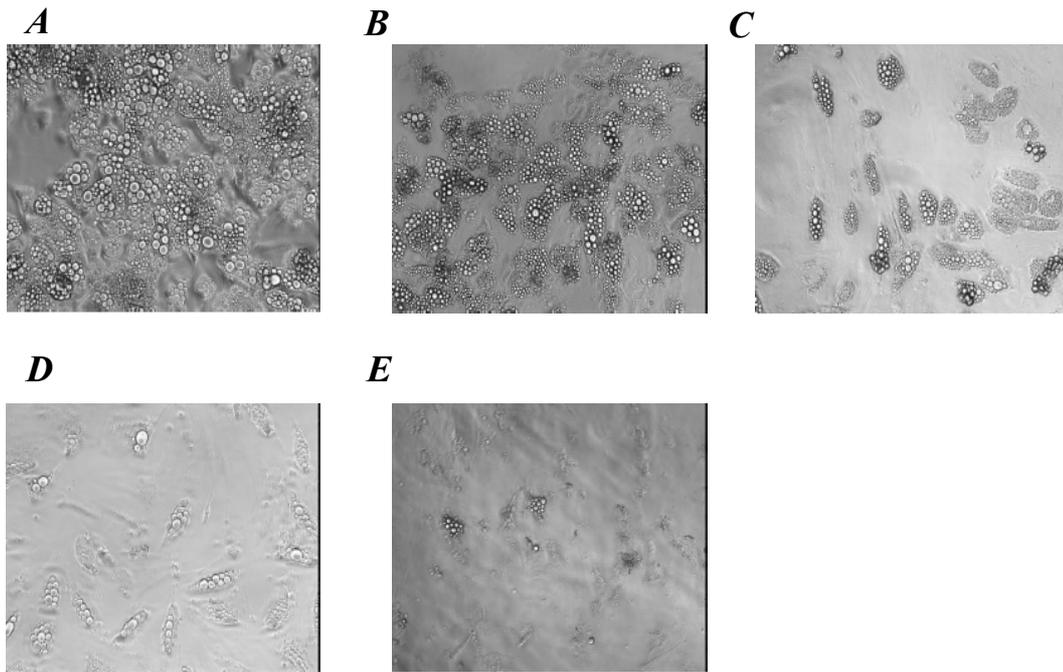


Fig. 11: valutazione del contributo adipogenico di quattro popolazioni “sortate” dalla SVF del tessuto adiposo sottocutaneo, prelevato da un paziente sottoposto ad addominoplastica. Le foto sono state scattate al decimo giorno di differenziamento cellulare, con un microscopio ottico e con un obiettivo 10X. Legenda: A: SVF ex-vivo; B: cellule CD34⁺/CD31⁻ (preadipociti); C: cellule CD34⁺/CD31⁺ (precursori endoteliali); D: cellule CD34⁻/CD31⁺ (endoteliali mature); E: cellule CD146⁺/CD34⁻/CD31⁻ (periciti).

Da una valutazione visiva al microscopio ottico, la SVF ex-vivo si conferma che possiede il più alto potenziale adipogenico in vitro (fig.11A), riuscendo a raggiungere la totalità di cellule differenziate in adipociti maturi all'interno del pozzetto. Le cellule “sortate” con il più alto grado adipogenico risultano le CD34⁺/CD31⁻ (fig. 11B), con una resa in adipociti maturi lievemente inferiore rispetto alla SVF ex-vivo. Le CD34⁺/CD31⁺ (fig. 11C) hanno mostrato un buon livello di differenziamento adipogenico, inferiore rispetto ai preadipociti ma comunque superiore alle cellule endoteliali mature (CD34⁻/CD31⁺) e ai periciti

(CD146⁺/CD34⁻/CD31⁻) (fig. 11D e 11E) le quali hanno rivelato sorprendentemente il potenziale adipogenico più basso.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio presentato in questa tesi ha contribuito a delineare più chiaramente il ruolo dei precursori adipocitari ed endoteliali del tessuto adiposo, all'interno del contesto patologico dell'obesità. Riconosciuta ufficialmente come una patologia, l'obesità è caratterizzata da un aumento della massa del tessuto adiposo bianco, pertanto è di vitale importanza investigare i meccanismi che ne regolano il suo accrescimento in condizioni patologiche. L'espansione del WAT avviene sia incrementando le dimensioni degli adipociti maturi (ipertrofia) e sia aumentando le quantità di precursori adipocitari, in un processo noto come crescita iperplastica del WAT (Wang A. Q. et al., 2013). Un suo accumulo nell'uomo è associato ad un elevato rischio di malattie cardiovascolari, diabete e mortalità (Carey et al., 1997). Gli esperimenti mostrati all'interno di questa tesi dimostrano che vi sono differenze sostanziali tra il tessuto adiposo sottocutaneo addominale e il deposito viscerale, in termini di quantità di preadipociti ADSC ($CD34^+/CD31^-/CD45^-$) e di precursori endoteliali ($CD34^+/CD31^+/CD45^-$). Questo studio inoltre ha messo in risalto la correlazione tra il marcatore delle cellule staminali ematopoietiche CD34, espresso dalla SVF ex-vivo e un suo possibile ruolo nell'adipogenesi.

Grazie ad un approccio di tipo citofluorimetrico multiparametrico messo a punto nel laboratorio endocrino-metabolico, è stato possibile quantificare inizialmente la contaminante di cellule $CD45^+$ co-esprimenti il CD34, e le cellule endoteliali $CD31^+$ co-esprimenti il CD34. L'analisi ha rivelato che la maggior parte delle cellule $CD45^+$ sono $CD34^-$ mentre la maggior parte delle cellule $CD31^+$ sono $CD34^+$, per entrambi i depositi tissutali analizzati nelle due categorie di pazienti

presi in esame. Queste quantificazioni hanno consentito di focalizzare le successive analisi all'interno di un gate morfologico R1 che non comprendesse le popolazioni CD45⁺/CD34⁺, presenti in percentuali molto basse all'interno della SVF del tessuto adiposo (<5%).

Confrontando la presenza di preadipociti CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻ nel SAT e VAT dei pazienti obesi e obesi DM2 è risultata una maggior presenza di tali cellule nel deposito viscerale rispetto alla controparte sottocutanea, per entrambe le categorie di pazienti presi in esame, con differenze significative nei pazienti obesi DM2. Analizzando e confrontando invece esclusivamente il SAT degli obesi, obesi DM2 e post-obesi risulta un quantitativo maggiore di precursori adipocitari nel SAT dei post-obesi, con un incremento fino al 70%. I dati ottenuti quantificando le popolazioni di precursori endoteliali nei due depositi adiposi delle medesime categorie di pazienti, sono risultati sorprendentemente opposti a quelli dei precursori adipocitari: vi è infatti una maggior presenza di tali popolazioni nel SAT rispetto al VAT di questi pazienti, e una percentuale leggermente superiore nel SAT degli obesi rispetto al SAT degli obesi DM2 e dei post-obesi.

Osservando questi dati, risultano chiaramente diverse caratteristiche tra i due depositi tissutali all'interno del contesto dell'obesità: il SAT, contenendo un più elevato numero di precursori endoteliali è risultato infatti possedere un profilo prevalentemente pro-angiogenico rispetto al VAT, mentre quest'ultimo che possiede un valore più elevato di precursori adipocitari risulta avere principalmente una caratteristica iperplastica, superiore a quella del SAT, fornendo un contributo maggiore nell'espansione del tessuto adiposo bianco che avviene nei pazienti obesi. Contrariamente ai dati di letteratura che assegnano al

SAT la migliore capacità differenziativa in termini adipogenici (Baglioni S., et al., 2012; Villaret A., et al., 2010; Roldan M., et al., 2011) i dati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica delineano un ruolo pro-adipogenico a favore del VAT e un ridotto contenuto di tali precursori nel SAT dei pazienti obesi, in linea con alcuni lavori scientifici in merito (Isakson P., et al., 2009; Oñate B., et al., 2012). Per spiegare una maggior predisposizione del SAT verso l'angiogenesi nell'obesità probabilmente bisognerebbe investigare il grado di ipossia a cui il deposito adiposo è soggetto nei pazienti obesi; è noto infatti che una up-regolazione dei geni coinvolti nell'ipossia comporta una elevata espressione di geni endoteliali e pro-angiogenici (Cao Y., 2013). Diversamente da quanto osservato nei soggetti obesi, il SAT dei soggetti post-obesi che hanno subito un calo ponderale in seguito a trattamento chirurgico in chirurgia bariatrica dimostra acquisire le caratteristiche del VAT dei soggetti obesi: i precursori adipocitari aumentano all'interno del tessuto in questione, compensando il numero di preadipociti eventualmente persi con il calo ponderale e assumendo caratteristiche iperplastiche. Alcuni lavori che dimostrano un aumento dei preadipociti nel SAT dopo trattamento chirurgico bariatrico (Rossmeislovà L., et al., 2013; Chen G. J., et al., 2012) suggeriscono un adattamento di questa popolazione all'interno del deposito adiposo dei post-obesi, allo scopo di ripristinare il quantitativo cellulare alle condizioni di obesità. Risulta interessante notare che nei pazienti obesi DM2 non si verifica una riduzione della staminalità in entrambi i depositi tissutali analizzati, se confrontati con i pazienti obesi non affetti da DM2. Sebbene in letteratura è noto un effetto riducente del diabete sul contenuto di precursori staminali che avviene nel midollo osseo e sulla loro mobilità (Fadini G. P., et al.,

2013), il tessuto adiposo appare non essere influenzato dalla complicità derivante dal diabete nel suo contenuto di precursori adipocitari ADSC CD34⁺.

Abbiamo osservato che all'interno delle cellule della SVF vi è un'elevata presenza di cellule che co-esprimono il CD34 con diversi marcatori di staminalità (CD90, CD73, CD13 e CD29), senza mostrare differenze tra i due depositi considerati e i gruppi di pazienti analizzati. È risultata invece una maggior presenza di cellule co-esprimenti il CD34 con il marcatore CD271 all'interno del tessuto adiposo viscerale dei pazienti obesi e obesi diabetici, suggerendo un ruolo diverso di queste cellule tra i due depositi. Anche se vi è una differenza ben rappresentata dalla popolazione CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻/CD271⁺ fra i due depositi adiposi presi in considerazione, non è nota infatti la sua funzione che potrebbe rivestire nel tessuto adiposo se confrontata con la popolazione CD271⁻.

Analizzando la co-espressione del CD34 e del CD31 con il marcatore pericitario CD146, la percentuale di cellule CD146⁺/CD34⁻/CD31⁻ è più alta nel SAT degli obesi e degli obesi DM2 rispetto al VAT, confermando la caratteristica pro-angiogenica del deposito sottocutaneo. Le cellule CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻ non mostrano sostanziali differenze tra i due depositi della categoria degli obesi, mentre il SAT degli obesi DM2 contiene un quantitativo maggiore di questa popolazione anche se confrontata con il SAT dei post-obesi. Tale deposito presenta quindi una propensione maggiore verso caratteristiche angiogeniche negli obesi affetti anche da DM2, aumentando il contenuto di precursori endoteliali. L'obesità associata al diabete di tipo 2 influenza quindi il quantitativo di cellule staminali endoteliali nel SAT. Tale ipotesi è suggerita da risultati ottenuti su topi obesi trattati con un inibitore dell'angiogenesi, in cui diminuendo

la densità vascolare veniva migliorata l'insulino sensibilità (Bråkenhielm E., et al., 2004). Alla luce dei dati ottenuti sulle cellule CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻ e CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻, considerando i dati di quantificazione dei precursori endoteliali CD34⁺/CD31⁻/CD45⁻, nei pazienti obesi con un'insulino sensibilità compromessa si sono verificate percentuali superiori di periciti che, molto probabilmente insieme ai precursori endoteliali aumenterebbero la vascolarizzazione nel SAT di questi pazienti. È da notare una netta differenza che si verifica nel SAT degli obesi DM2 ad opera della popolazione CD146⁺/CD31⁺/CD34⁻: tale deposito risulta infatti possedere un maggior quantitativo di precursori endoteliali più maturi se confrontati con la popolazione CD146⁺/CD31⁻/CD34⁻, in quanto vi è la presenza del marcatore endoteliale CD31. La popolazione CD146⁺/CD31⁻/CD34⁺ è scarsamente presente in entrambi i depositi tissutali, tuttavia risulta maggiormente presente nel VAT degli obesi (fig. 6B) e nel SAT dei post-obesi (fig. 7B), suggerendo ancora una volta una presenza necessaria del marcatore CD34 nelle condizioni pro-adipogeniche.

L'analisi del potenziale adipogenico della SVF ha rivelato che le cellule riducono la capacità differenzativa durante i passaggi in vitro, parallelamente alla down-regolazione dell'mRNA codificante per il CD34 e per Zfp423 che si verifica in vitro nei passaggi in coltura, avvalorando ulteriormente l'ipotesi di un ruolo del CD34 nell'adipogenesi associata ad una riduzione del marcatore dei preadipociti (Zfp423). Tali dati riguardanti la down-regolazione del CD34 nella SVF in vitro sono in accordo con i risultati mostrati in alcuni lavori in merito (Maumus M., et al., 2011; Braun J., et al., 2012; Suga H., et al., 2009). I livelli di espressione del CD90 risultano invece opposti a quelli del CD34, i suoi livelli infatti aumentano

durante i passaggi in coltura. Il CD90 è un marcatore di fibrosi e dei fibroblasti, e una sua up-regolazione che notoriamente avviene in vitro è accompagnata anche ad un aumento delle dimensioni cellulari e nucleari che avvengono nelle cellule della SVF in coltura, ipotizzando un aumento della capacità di adesione delle cellule. Inoltre, una perdita di potenziale adipogenico che avviene in coltura è associata anche ad una maggior presenza di proteine citoscheletriche quali la F-actina, la β -tubulina e la vimentina. Si nota infatti un'intensa colorazione dei microfilamenti (F-actina) che indica una direzionalità di crescita delle cellule in vitro, mentre una forte colorazione dei filamenti intermedi associata alla vimentina suggerisce un aumento della tensione e della rigidità cellulare che accade nei passaggi in coltura.

Per identificare la sottopopolazione cellulare che contribuisce maggiormente alla capacità adipogenica della SVF, mediante la tecnica del sorting cellulare al citofluorimetro sono state separate dalla SVF stessa le sottopopolazioni dei preadipociti $CD34^+/CD31^-/CD45^-$, dei precursori endoteliali $CD34^+/CD31^+/CD45^-$, delle cellule endoteliali mature $CD34^-/CD31^+/CD45^-$, e dei periciti $CD146^+/CD34^-/CD31^-$. Sottoponendo tali sottopopolazioni di cellule a stimoli adipogenici, è risultato che il maggior contributo adipogenico è risultato ad opera dei preadipociti a livelli paragonabili al contributo fornito dalla SVF ex-vivo. Nella scala adipogenica seguono poi la popolazione dei precursori endoteliali, delle cellule endoteliali mature e dei periciti, rispettivamente. Questi dati rafforzano l'idea della necessità del coinvolgimento del CD34 nel processo di differenziamento adipogenico e che viene espresso dalle cellule dei preadipociti e dai precursori endoteliali (Li H., et al., 2011), mentre una perdita del CD34 è

accompagnata ad una transizione endoteliale. Sorprendentemente, i periciti sono risultati possedere il potenziale adipogenico più basso, nonostante la letteratura scientifica la identifichi come una popolazione staminale universale (Zimmerlin L., et al., 2012). Tuttavia, bisogna tener conto del fatto che le popolazioni sortate hanno subito un processo di stress cellulare dovuto alla selezione effettuata dal citofluorimetro, e che l'abbondanza dei preadipociti contenuti nella SVF non è paragonabile alla quantità totale di periciti presenti: tali variabili potrebbero infatti giocare un ruolo diverso ed influire sul potenziale adipogenico di queste sottopopolazioni in vitro. Alla luce dei risultati che correlano l'espressione del CD34 con un contributo adipogenico, poichè la popolazione dei periciti non esprime il CD34 non è di conseguenza in grado di differenziare in termini adipogenici.

PROSPETTIVE FUTURE

In collaborazione con il laboratorio del Prof. A. Rosato dell'Istituto Oncologico Veneto (IOV), la SVF è stata trasfettata con un vettore lentivirale in grado di rendere le cellule competenti ad esprimere la luciferasi. In questo modo le cellule possono essere inoculate all'interno di topi NOD/SCID immunodeficienti per via endovenosa ed essere tracciate grazie alla bioluminescenza emessa dalle cellule stesse, una volta somministrata la luciferina ai topi. L'analisi di imaging effettuata sui topi mediante TAC ha dimostrato che le cellule inoculate nell'animale ospitante sopravvivono con successo almeno per le prime 48 ore dall'inoculo, ferme a livello polmonare (Fig. 1). In futuro si potranno progettare esperimenti di co-trasfezione delle cellule con la luciferasi e con altri vettori di tracciamento (es. GFP) inoculando le stesse nella cavità peritoneale del topo, in prossimità del tessuto adiposo viscerale allo scopo di studiarne le capacità di homing e le potenzialità adipogeniche nel tessuto adiposo, sottoponendo gli organismi ospitanti ad HFD e analizzando così un possibile ruolo e contributo delle varie sottopopolazioni della SVF nello sviluppo dell'obesità. L'ipotesi di utilizzare un secondo tracciante deriva dal fatto che, mentre la luciferasi può essere sfruttata per l'imaging in vivo, un co-tracciante come la GFP può essere sfruttato per valutare e confermare la localizzazione delle cellule inoculate tramite western blot o immunohistochimica. Inoltre, si potrebbero inoculare le sottopopolazioni selezionate citate in questo lavoro mediante sorting, direttamente in diversi depositi di tessuto adiposo (SAT, VAT e BAT) e valutare così il potenziale

adipogenico e l'eventuale capacità delle cellule a differenziare verso i fenotipi bianco, bruno e beige.

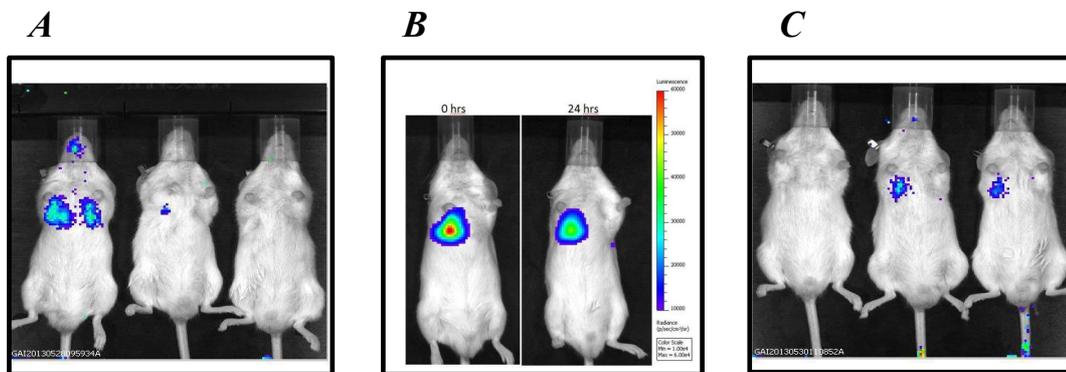


Fig. 1: imaging mediante TAC di topi NOD/SCID inoculati con SVF umana trasfettata con luciferasi. A: post-inoculo; B: 24 ore dall'inoculo; C: 48 ore dall'inoculo. Si possono osservare le cellule della SVF ferme a livello polmonare, con un picco di intensità di segnale rilevato a 24 ore dall'inoculo. Il segnale rilevato dallo strumento è composto da una scala colorimetrica, dove il rosso indica una maggior concentrazione di cellule che corrisponde ad un segnale più alto, mentre un segnale di intensità progressivamente più debole assume una colorazione tendente all'azzurro/blu.

BIBLIOGRAFIA

- Abate N., et al., *Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men*, J. Clin. Inv., 1995. 96: 88-98.
- Andersen C.D., et al., *Non-cultured adipose-derived CD45- side population cells are enriched for progenitors that give rise to myofibres in vivo*, Exp. Cell Res., 2008. 314: p. 2951-2964.
- Atit R., et al., *Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse*, Dev. Biol., 2006. 296: p. 164-76.
- Baglioni S., et al., *Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell*, PloS ONE, 2012. 7 (5): p. 1-13.
- Bailey A. M., et al., *Characterization of adipose-derived stem cells: an update*, Cur. Stem Cells Res. & Th., 2010. 5(2): p. 95-102.
- Bardin B., et al., *S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen*, Tissue Antigens, 1996. 48(5): p. 531-539.
- Barneda D., et al., *Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the “browning” of white adipose tissues*, Biochim. Biophys. Acta., 2013. 1831:p. 924-933.
- Berry R. e Rodeheffer M. S., *Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo*, Nat. Cell Biol., 2013. 15 (3): p. 302-4.

- Berry R., et al., *Esrrg functions in early branch generation of the ureteric bud and is essential for normal development of the renal papilla*, Hum. Mol. Genet., 2011. 20: p. 917-926.
- Berry R., et al., *Weighing in on Adipocyte Precursors*, Cell Metab., 2014. 19: 8-20.
- Billon N., et al., *Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage embryonic stem cells in vitro*, Methods Mol. Biol., 2006. 330: p. 15-32.
- Bråkenhielm E., et al., *Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice*, Circ. Res., 2004. 94: p. 1579-1588.
- Braun J., et al., *Concerted Regulation of CD34 and CD105 Accompanies Mesenchymal Stromal Cell Derivation from Human Adventitial Stromal Cell*, Stem Cells and Devel., 2012. 0(0): p. 1- 13.
- Bushati N. e Cohen M. S., *microRNA functions*, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 2007. 23: p. 175-205.
- Cai X., et al., *Adipose stem cells originate from perivascular cells*, Biol. Cell, 2011: 103: p. 435-447.
- Cannon B. e Nedergaard J., *Brown adipose tissue: function and physiological significance*, Physiol. Rev., 2004. 84: p. 277-359.
- Cao Y., *Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, Adipose Metabolism, and Insulin Sensitivity*, Cell Metab., 2013. 18: p. 478-489.
- Carey J. V., et al., *Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women*, Am. J. Epidemiol., 1997. 145: p. 614-619.

- Chau Y. Y., et al., *Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1*, PLoS Genet., 2011.
- Chau Y. Y., et al., *Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source*, Nat. Cell Biol., 2014. 16(4): p. 367-6.
- Chen C. W., et al., *Human pericytes for ischemic heart repair*, Stem Cells, 2013. 31: p. 305-316.
- Chen G. J., et al., *Adipogenic differentiation of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells: effect of gastric bypass surgery*, Surg. Endosc., 2012. 26: p. 3449-3456.
- Cinti S., *The adipose organ*, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 2005. 73: p. 9-15.
- Civin C. I., et al., *Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells*, J. Immunol., 1984. 133: p. 157-165.
- Corselli M., et al., *Identification of Perivascular Mesenchymal Stromal/Stem Cells by Flow Cytometry*, Cytometry Part A, 2013. 83A: p. 714-720.
- Corselli M., et al., *The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells*, Stem Cells Dev., 2012. 21: p. 1299-1308.
- Crisan M., et al., *A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle*, Stem Cells, 2008. 26: p. 2425-2433.

- Crossno J. T., et al., *Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells*, J. Clin. Invest., 2006. 116: p. 3220-3228.
- Di Franco A., et al., *Dissecting the Origin of Inducible Brown Fat in Adult Humans Through a Novel Adipose Stem Cell Model from Adipose Tissue Surrounding Pheochromocytoma*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 2014. 99 (10): p. E1903-E1912.
- Diehl A. M. e Hoek B. J., *Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "The benefits of losing control"*, J. Bioenerg. Biomembr., 1999. 31: p. 493-506.
- Doherty J. M., et al., *Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo*, J. Bone Miner. Res., 1998. 13: p. 828-838.
- Enerbäck S., *The Origins of Brown Adipose Tissue*, The New Eng. J. of Med., 2009.
- English J. T., et al., *Association of pheochromocytomas with brown fat tumors*, Radiology, 1973. 107: p. 279-281.
- Essafi A., et al., *A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression*, Dev. Cell, 2010. 21: p. 559-574.
- Fadini G. P., et al., *Diabetes Impairs Stem Cell and Proangiogenic Cell Mobilization in Humans*, Diabetes Care, 2013. 36: p. 943-949.
- Faust I. M., *Adipose tissue regeneration following lipectomy*, Science, 1977. 197: p. 391-393.

- Festa E., et al., *Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling*, Cell, 2011. 146: p. 761-771.
- Frontini A., et al., *White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma*, Biochim. Biophys. Acta., 2013. 1831: 950-959.
- Gesta S., et al., *Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source*, Cell, 2007.
- Guilak F., et al., *Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived stem cells*, J. Cell Physiol., 2006. 206: p. 229-237.
- Gupta K. R., et al., *Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423*, Nature, 2010. 464: p. 619-623.
- Gupta K. R., et al., *Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells*, Cell Metab., 2012. 15: p. 230-239.
- Güven S., et al., *Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue*, Biomaterials, 2011. 32: p. 5801-5809.
- Hermida-Gomez T., et al., *Bone marrow cells immunomagnetically selected for CD271+ antigen promote in vitro the repair of articular cartilage defects*, Tissue Eng. Part A, 2011. 17: p. 1169-1179.
- Hilton C., et al., *MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity*, Int. J. Obes., 2005.
- Hudak C. S. e Sul H. S., *Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis*, Front. Endocrinol., 2013.

- Hudak C. S., *Pref-1 Marks Very Early Mesenchymal Precursors Required for Adipose Tissue Development and Expansion*, Cell Reports, 2014. 8: p. 678-687.
- Huttunen P., et al., *The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers*, Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol., 1981. 46: p. 339-345.
- Isakson P., et al., *Impaired Preadipocyte Differentiation in Human Abdominal Obesity- Role of Wnt, Tumor Necrosis Factor- α , and Inflammation*, Diabetes, 2009. 58: p. 1550-1557.
- Jespersen N. Z., et al., *A Classical Brown Adipose Tissue mRNA Signature Partly Overlaps with Brite in the Supraclavicular Region of Adult Humans*, Cell Metab., 2013. 17: p. 798-805.
- Jiang Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*, Nature, 2002. 418: p. 41-49.
- Jimenez M., et al., *Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat*, Eur. J. Biochem., 2003. 270: p. 699-705.
- Joe A. W., et al., *Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet*, Stem Cells, 2009. 27: p. 2563-2570.
- Kang H. J., *In vitro 3D model for human vascularized adipose tissue*, Tissue Eng. A., 2009. 15: p. 2227-2236.
- Kim J. Y., et al., *Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue*, J. Clin. Inv., 2007. 117: p. 2621-2637.

- Knittle J. L., *Adipose tissue development in man*, New York: Plenum Press, 1978.
- Kontani Y., et al., *UCPI deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age*, *Aging Cell*, 2005. 4: p. 147-155.
- Krause D. S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility*, *Blood*, 1996: 87: p. 1-13.
- Kuci S., et al., *CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties*, *Haematologica*, 2010. 95: p. 651-659.
- Kusminski C. M., et al., *MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity*, *Nat. Med.*, 2012. 18: p. 1539-1549.
- Lee H. Y. e Granneman G. J., *Seeking the source of adipocytes in adult white adipose tissue*, *Adipocytes*, 2012. 1: p. 230-236.
- Lee H. Y., et al., *Identification of an Adipogenic Niche for Adipose Tissue Remodeling and Restoration*, *Cel Metab.*, 2013. 18: p. 355-367.
- Lee H. Y., et al., *In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding*, *Cell Metab.*, 2012. 15: p. 480-491.
- Lenders J. W., et al., *Phaeochromocytoma*, *Lancet*, 2005. 366: p. 665-675.
- Li H., et al., *Adipogenic Potential of Adipose Stem Cell Subpopulations*, *PRSJ*, 2011. 128 (3): p. 663-672.
- Lin G., et al., *Defining stem and progenitor cells within adipose tissue*, *Stem Cells Dev.*, 2008. 17: p. 1053-1063.

- Lin Y., et al., *Identification of osteo-adipo progenitor cells in fat tissue*, Cell Prolif., 2008. 41: p. 803-812.
- Liu W., et al., *A heterogeneous lineage origin underlies the phenotypic and molecular differences of white and beige adipocytes*, J. Of Cell Science, 2013. 126 (16): p. 3527-3532.
- Liu W., et al., *miR-133a regulates adipocyte browning in vivo*, PloS Genet., 2013.
- Loncar D., *Brown adipose tissue as a derivative of mesoderm grafted below the kidney capsule. A model for differentiation of isolated rat mesoderm*, Int. J. Dev. Biol., 1992. 36: p. 265-274.
- Lowell B. B., et al., *Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue*, Nature, 1993. 366: p. 740-742.
- Macotela Y., et al., *Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots*, Diabetes, 2012. 61: p. 1691-1699.
- Madonna R. e De Caterina R., *In vitro neovasculogenic potential of resident adipose tissue precursors*, Am .J. Physiol. Cell Physiol., 2008. 295: p. C1271-C1280.
- Majka M. S., et al., *Concise Review: adipocyte origins: weighing the possibilities*, Stem Cells, 2011. 29: p. 1034-1040.
- Martinez-Estrada M. O., et al., *Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin*, Nat. Genet., 2010. 42: p. 89-93.
- Maumus M., et al., *Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype*, Int. J. of Obes., 2011. P.: 1-13.

- McLaughlin T., et al., *Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 2011. 96: E1756-E1760.
- Mitterberger C. M., et al., *DLK1 (PREF1) is a negative regulator of adipogenesis in CD105+/CD90+/CD34+/CD31-/FABP4- adipose-derived stromal cells from subcutaneous abdominal fat pads of adult women*, Stem Cell Res., 2012. 9: p. 35-48.
- Miyazaki Y. E DeFronzo R., *Visceral fat dominant distribution in male type 2 diabetic patients is closely related to hepatic insulin resistance, irrespective of body type*, Cardiovasc. Diabetol., 2009.
- Nedergaard J., et al., *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2007. 293: p. E444-E452.
- Oñate B., et al., *The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients*, The FASEB J., 2012. 26: p. 1-10.
- Ouhtit A., et al., *Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146*, Bioch. And Biophys. Acta., 2009. 1795(2): p. 130-136.
- Pittenger F. M., et al., *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*, Circ. Res, 2004. 95: p. 9-20.
- Planat-Benard V., et al., *Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives*, Circulation, 2004. 109: p. 656-663.

- Prins B. J. e O’Rahilly S., *Regulation of adipose cell number in man*, Clin. Sci. (Lond.), 1997. 92: p. 3-11.
- Quirici N., et al., *Anti-L-NGFR and –CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue*, Stem Cells and Develop., 2010. 19(6): p. 915-925.
- Rodeheffer M. S. ,et al., *Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo*, Cell, 2008. 135: p. 240-249.
- Roldan M., et al., *Obesity short-circuit stemness gene network in human adipose multipotent stem cells*, The FASEB J., 2011. 25: p. 1-16.
- Rosenwald M. e Wolfrum C., *The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes*, Adipocyte, 2014. 3 (1): p. 4-9.
- Rossmeislovà L., et al., *Weight Loss Improves the Adipogenic Capacity of Human Preadipocytes and Modulates Their Secretory Profile*, Diabetes, 2013. 62: p. 1990-1995.
- Scherberich A., et al., *A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue*, World J. Stem Cells, 2013. 5(1): p. 1-8.
- Scherberich A., et al., *Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity*, Stem Cells, 2007. 27: p. 1823-1829.
- Seale P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*, Nature, 2008. 454: p. 961-8.

- Seale P., et al., *Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice*, J. Clin. Invest., 2011. 121: p. 96-105.
- Seale P., et al., *Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16*, Cell Metab., 2007. 6: p. 38-54.
- Sengenès C., et al., *Preadipocytes in the Human Subcutaneous Adipose Tissue Display Distinct Features From the Adult Mesenchymal and Hematopoietic Stem Cells*, J. Of Cell. Physiol., 2005: 205: p. 114-122.
- Sera Y., et al., *Hematopoietic stem cell origin of adipocytes*, Exp. Hematol., 2009. 37: p. 1108-1120.
- Sharp L. Z., et al., *Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells*, PLoS ONE, 2012.
- Shih I. M., et al., *The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology*, The J. Of Path., 1999. 189(1): p. 4-11.
- Smas C. M. e Sul H. S., *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation*, Cell, 1993. 73: p. 725-734.
- Smas C. M., et al., *Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation*, Mol. Cell. Biol., 1997. 17: p. 977-988.
- Spalding K. L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*, Nature, 2008. 453: p. 783-787.
- Spiegelman B. M. e Flier J. S., *Obesity and the regulation of energy balance*, Cell, 2001. 104: p. 531-543.

- Suga H., et al., *Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells*, Stem Cells and Develop., 2009. 18(8): p. 1201-1210.
- Sun K., et al., *Adipose tissue remodeling and obesity*, J. Clin. Inv., 2011. 121: p. 2094-2101.
- Sun L., et al., *Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation*, Nat. Cell Biol., 2011. 13: p. 958-965.
- Tallone T., et al., *Adult Human Adipose Tissue Contains Several Types of Multipotent Cells*, J. Of Cardiovasc. Trans. Res., 2011. 4: p. 200-210.
- Tang W., et al., *White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature*, Science, 2008. 322: p. 583-586.
- Tchkonja T., et al., *Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultures and cloned human preadipocytes*, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2001. 282: p. R1286-R1296.
- Trajkovski M., et al., *MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16*, Nat. Cell Biol., 2012. 14: 1330-1335.
- Tran K. V. et al., *The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells*, Cell Metab., 2012. 15: p. 222-229.
- Trempus C. S., et al., *CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice*, Cancer Res., 2007. 67: p. 4173-4181.
- Uezumi A., et al., *Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle*, Nat. Cell Biol., 2010. 12: p. 143-152.

- Villaret A., et al., *Adipose Tissue Endothelial Cells From Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence*, *Diabetes*, 2010. 59: p. 2755-2763.
- Vitali A., et al., *The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes*, *J. Lipid Res.*, 2012. 53: p. 619-29.
- Walden B. T., et al., *Distinct expression of muscle-specific microRNAs (myomirs) in brown adipocytes*, *J. Cell. Physiol.*, 2009. 218: p. 444-449.
- Waldén B. T., et al., *Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite”, and white adipose tissues*, *AM. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2012. 302: p. E19-E31.
- Wang A. Q., et al., *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*, *Nat. Med.*, 2013. 19: p. 1338-1345.
- Wang Z. e Yan X., *CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion*, *Cancer Lett.*, 2013. 330: p. 150-162.
- WHO, *Obesity and overweight*, WHO(World Health Organization), 2013.
- Wu J., et al., *Beige Adipocytes are a distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human*, *Cell*, 2012. 150 (2): p. 366-376.
- Yamamoto Y., et al., *Adipose depots possess unique developmental gene signatures*, *Obesity*, 2010. 18: p. 872-878.

- Yin H., et al., *MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16*, Cell Metab., 2013. 17: p. 210-224.
- Zimmerlin L., et al., *Mesenchymal Markers on Human Adipose Stem/Progenitor Cells*, Cytometry Part A, 2013. 83A: 134-140.
- Zimmerlin L., et al., *Pericytes: A Universal Adult Tissue Stem Cell?*, Cytometry Part A, 2012. 81A: p. 12-14.
- Zimmerlin L., et al., *Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue*, Cytometry, Part A, 2010. 77(1): p. 22-30.
- Zuk A. P., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications force-based therapies*, Tissue Eng., 2001. 7: p. 211-228.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione della mia formazione universitaria, desidero ringraziare fortemente i miei genitori, mio continuo sostegno morale. A mia madre, che è sempre stata tutte le mie ragioni. A mio padre, roccia inscalfibile, pigro perenne, Luce guida della famiglia. A mia sorella Paola, con l'augurio più vivo che possa realizzare tutti i suoi desideri, e con l'accesa speranza che possa persistere e resistere lungo tutte le sue difficoltà quotidiane.

Alle mie nonne, cento di questi anni, il tempo non vi domerà mai.

Ai miei nonni, Maestri di vita, Luce del mio sentiero, Pilastri della famiglia.

A zio Lino, che tutto possa andare per il meglio e ritorni ad avere lo spirito di una volta.

A zio Biagio, possa il suo Coraggio accompagnarlo sempre nelle varie missioni.

A Luca, mia fonte d'ispirazione.

A Giuseppe e Antonio, gli Amici di sempre, gli Amici di una vita, con gli Auguri più vivi per un futuro costellato da soddisfazioni.

A Simone, con la speranza che possa sempre fornire tutto l'amore necessario a Paola.

Ai miei coinquilini, con l'Augurio che possano realizzare tutti i loro desideri.

A Marnie, Catia e Sonia, Mamme del laboratorio.

Ad Alessandra, Alessia, Giovanna e zia Betty, con l'Augurio che possano realizzarsi.

Al Prof. Vettor che mi ha accolto nel suo laboratorio.

E infine, Grazie alla mia Infinita Pazienza: senza di essa non avrei raggiunto questo terzo traguardo!