



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Dello Sbarba Persio

*IL TRATTAMENTO CON TESTOSTERONE O OCA
MIGLIORA LE ALTERAZIONI DEL TESSUTO ADIPOSO
VISCERALE INDOTTE DALLA SINDROME METABOLICA
ATTRAVERSO LA NORMALIZZAZIONE
DELL'INSULINO-SENSIBILITÀ: UNO STUDIO
SPERIMENTALE NEL CONIGLIO*

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

Dottorando
Dott. Maneschi Elena

Tutore
Prof. Maggi Mario

Coordinatore
Prof. Forti Gianni

Anni 2011/2013

A Miriam e Christian, la cosa più bella della mia vita.

Indice

Introduzione.....	5
Fisiologia del tessuto adiposo	5
Adipogenesi	8
Le adipochine.....	13
Adipociti, bilancio energetico e disfunzione del tessuto adiposo.....	19
Sindrome metabolica	21
Sindrome metabolica e ipogonadismo.....	23
Sindrome metabolica e obesità centrale	27
Ipogonadismo e obesità centrale: quale è la causa e qual è l'effetto?	29
Ruolo degli androgeni nel regolare l'accumulo di grasso.....	32
Ruolo di FXR nel regolare l'insulino-sensibilità e l'adiposità	35
Scopo della tesi.....	40
Materiali e metodi	42
Trattamento degli Animali.....	42
Misurazione dei parametri biochimici	43
Test di tolleranza al glucosio per via orale	44
Analisi morfometrica di sezioni di tessuto adiposo viscerale.....	44
Rilevamento dell'ipossia e immunoistochimica.....	44
Analisi Western Blot.....	45
Istologia del fegato	45
Analisi immunoistochimica dell'espressione del TNF α	46
Isolamento dei preadipociti dal tessuto adiposo viscerale.....	46
Caratterizzazione immunofenotipica mediante citometria a flusso.....	47
Protocollo di differenziazione adipogenica	48

Valutazione qualitativa e quantitativa dell'accumulo di trigliceridi	48
Microscopia a fluorescenza	49
Microscopia confocale.....	49
Immunolocalizzazione di GLUT4 e SNAP23	50
Saggio di captazione del glucosio.....	50
Estrazione dell'RNA e analisi quantitativa RT-PCR (qRT-PCR).....	51
Analisi Statistiche	51
Approvazione del comitato etico	52
Risultati	53
Effetti della dieta ricca in lipidi nei conigli	53
Effetti della dieta ricca in lipidi nelle rPAD isolate dal grasso viscerale	57
Effetti del trattamento <i>in vivo</i> con testosterone sulle caratteristiche della sindrome metabolica HFD-indotte	60
Effetti del trattamento <i>in vivo</i> con testosterone nelle rPAD isolate dal grasso viscerale	61
Effetti del trattamento <i>in vivo</i> con OCA sulle caratteristiche della sindrome metabolica HFD-indotte	63
Effetti del trattamento <i>in vivo</i> con OCA nelle rPAD isolate dal grasso viscerale	65
Discussione.....	68
Tabelle	80
Figure.....	91
Bibliografia.....	116
Appendice.....	156
Abstract pubblicazioni candidata.....	156

Introduzione

Fisiologia del tessuto adiposo

Fino a pochi anni fa il tessuto adiposo veniva considerato unicamente come sede di riserva energetica. Questo concetto di “riserva”, unito alla mancanza di una precisa localizzazione anatomica, sono state tra le cause che hanno contribuito a far sì che gli studi sul tessuto adiposo da parte della comunità scientifica fossero molto scarsi. La recente diffusione epidemica dell’obesità e delle sue complicanze cliniche negli ultimi vent’anni ha attirato l’attenzione dei ricercatori sul tessuto adiposo (Bray GA, Bellanger T, 2006). In particolare, l’interesse per questo campo di studio è derivato dalla scoperta che il tessuto adiposo è la sede di produzione e secrezione della leptina, un ormone in grado di influenzare uno dei più importanti comportamenti istintivi dell’uomo, l’assunzione del cibo (Friedman JM, 2004). Attualmente il tessuto adiposo viene considerato non più come semplice riserva energetica, ma come un importante organo endocrino che ha numerosi bersagli, fra cui alcune aree del cervello, come l’ipotalamo. Pertanto, il tessuto adiposo è importante non solo per la patologia che consegue ad un suo accumulo eccessivo, ma anche perché partecipa al mantenimento dell’omeostasi di numerosi processi biologici. Il tessuto adiposo è, infatti, coinvolto sia nella regolazione della massa grassa e nell’omeostasi dei nutrienti, che nella risposta immunitaria, nel controllo della pressione sanguigna, nell’emostasi, nel controllo delle funzioni tiroidee e del sistema riproduttivo (Trayhurn P, 2005; Grant RW, Dixit VD, 2015). Questi processi sono coordinati principalmente attraverso la sintesi e il rilascio di ormoni (adipochine) da parte dei costituenti cellulari del tessuto adiposo, chiamati adipociti. Gli adipociti sono dunque cellule deputate alla sintesi dei trigliceridi, processo definito lipogenesi, ed al loro rilascio in circolo sottoforma di glicerolo più acidi grassi, processo definito lipolisi. La lipogenesi è un processo regolato dall’azione di un enzima, la lipoprotein-lipasi (LPL), sintetizzato e secreto dagli adipociti, che viene trasportato all’endotelio dove agisce idrolizzando i trigliceridi, provenienti dalle lipoproteine, e liberando così gli acidi grassi e il monoacilglicerolo. La glicosilazione della LPL costituisce un passaggio di regolazione importante sia per la sua secrezione che

per la sua attività enzimatica. L'attività dell'LPL aumenta dopo i pasti, probabilmente grazie alla stimolazione da parte dell'insulina stessa, permettendo la clearance dei lipidi dal circolo ematico e il loro immagazzinamento nel tessuto adiposo. L'azione dell'LPL è influenzata anche da altri fattori, quali l'adenosina, che la stimola, e il cortisolo, che agisce favorendo l'azione dell'insulina; l'attività dell'LPL è pertanto ridotta in assenza di insulina. Tra gli ormoni che inibiscono l'azione dell'LPL ricordiamo le catecolamine. Il metabolismo del glucosio è essenziale all'interno dell'adipocita: fornisce energia e permette di mantenere un normale grado di esterificazione degli acidi grassi liberi; durante la glicolisi si forma l' α -glicerofosfato con il quale vengono esterificati gli acidi grassi liberi per formare i trigliceridi (Herman MA, Kahn B, 2006). Gli adipociti sono anche in grado, attraverso la lipolisi, di rilasciare in circolo gli acidi grassi che vengono utilizzati dalla maggior parte dei tessuti come fonte di energia quando il glucosio non è presente in concentrazione sufficiente. La lipolisi dipende principalmente dall'azione della lipasi ormono-sensibile (HSL), enzima che idrolizza i trigliceridi liberando acidi grassi e glicerolo (Jaworski K et al., 2007). L'attività dell'enzima dipende dalla sua fosforilazione e gli ormoni che influenzano la lipolisi agiscono proprio regolando questo stato. Il principale meccanismo di regolazione avviene attraverso l'azione della protein chinasi A (PKA), enzima la cui funzione viene attivata dall'aumento dei livelli di adenosina monofosfato ciclico (AMPc) derivanti dalla stimolazione dell'adenilato ciclasi. Esistono anche altre protein chinasi che mediano la fosforilazione di HSL, come la protein chinasi mitogeno-attivata (MAPK) e la protein chinasi AMP-attivata (AMPK). Tra gli stimoli lipolitici sono compresi le catecolamine, il glucagone, l'ormone della crescita (GH), il cortisolo e l'ormone tireostimolante (TSH). L'ormone anti-lipolitico più importante è l'insulina, la cui azione regola negativamente lo stato fosforilato di HSL. L'azione di HSL è resa complicata anche dalla proteina perilipina, presente sulla membrana delle goccioline lipidiche intracellulari, che agisce come uno strato protettivo per prevenire l'azione dell'enzima (Brasaemle DL 2007). Un'azione antilipolitica locale viene svolta da molecole direttamente prodotte dagli adipociti, tra cui adenosina e prostaglandine. L'orientamento

dell'adipocita verso l'una o l'altra via metabolica dipende soprattutto dallo stato nutrizionale dell'organismo.

La maggior parte dei mammiferi hanno depositi adiposi stereotipati situati in tutto il corpo. Alcuni di questi depositi hanno prevalentemente una funzione di supporto strutturale, contribuendo solo in minima parte al mantenimento dell'omeostasi energetica, come nel caso del tessuto sotto ai polpastrelli o il tessuto adiposo retroorbitale. Il tessuto adiposo che, invece, si trova a stretto contatto con la pelle prende il nome di sottocutaneo, mentre quello che si deposita a livello del mesentere intestinale e del retroperitoneo prende il nome di viscerale. Quest'ultimo drena direttamente nella circolazione portale ed è stato correlato a numerose morbilità associate con l'obesità, come diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari. Gli adipociti e i precursori cellulari isolati da questi diversi depositi presentano differenze sia per quanto riguarda il potenziale replicativo sia per quanto riguarda le risposte ai segnali ormonali, anche se le basi di queste distinzioni non sono ancora chiare (Giorgino F et al., 2005). Tutti i mammiferi possiedono due tipi di adipociti che condividono la capacità di accumulare lipidi (trigliceridi), ma presentano notevoli differenze anatomiche e funzionali; questi due citotipi vengono definiti adipociti bianchi e adipociti bruni. Gli adipociti bianchi maturi presentano un vacuolo centrale ricco di trigliceridi, che schiaccia in periferia il nucleo, e un sottile strato citoplasmatico. Gli adipociti bruni hanno invece un nucleo centrale e grossi mitocondri, con piccole goccioline di trigliceridi sparse nel citoplasma. Gli adipociti bianchi hanno un tradizionale ruolo di deposito di molecole ad alta energia, mentre gli adipociti bruni sono deputati alla termogenesi. Gli adipociti bruni si distinguono da quelli bianchi per l'espressione della proteina-1 di disaccoppiamento (UCP-1) che è in grado di disperdere il gradiente protonico generato nella catena di trasporto elettronico all'interno del mitocondrio a livello della sua membrana interna, determinando la produzione di calore al posto di ATP (Cannon B et al., 1982; Cinti S et al., 1989; Klaus S et al., 1991; Richard D, Picard F, 2011). Nei roditori il tessuto bruno è piuttosto diffuso e i molteplici pannicoli adiposi si collegano a livello interscapolare. Nell'uomo, invece, il tessuto bruno circonda il cuore e alcuni grandi vasi durante l'infanzia,

riducendosi però notevolmente con la crescita, fino a trovare solo alcune piccole isole cellulari all'interno dei depositi di tessuto adiposo bianco. Pertanto non esistono depositi esclusivi di tessuto adiposo bianco o tessuto adiposo bruno, ma sempre e comunque depositi misti, dove le relative percentuali differiscono in base alla localizzazione topografica. Da questi studi è quindi emerso un nuovo e innovativo concetto di anatomia funzionale che sovverte il modo di pensare al tessuto adiposo. Tale concetto consiste nel considerarlo non più come tale, ma come un organo: l'organo adiposo. L'anatomia definisce un organo come un insieme di tessuti, organizzati in una struttura disseccabile, che cooperano ad un fine strategico funzionale (Cinti S, 2005). Di conseguenza, per poter parlare di organo, devono essere presenti almeno due tessuti distinti tra loro, ma cooperanti per lo stesso fine. L'organo adiposo è infatti costituito dal tessuto adiposo bianco e dal tessuto adiposo bruno, composti, come abbiamo visto, da due citotipi assai diversi nella loro anatomia e nella loro funzione. I due tessuti hanno però una funzione unitaria nel controllo del metabolismo energetico e questo implica l'esistenza di un certo grado di plasticità dell'organo e di interconversione tra loro (Cinti S, 2001).

Adipogenesi

Il tessuto adiposo è costituito da due componenti principali distinte: una è quella degli adipociti, cellule completamente differenziate, l'altra viene chiamata nell'insieme frazione vasculo-stromale e comprende preadipociti, cellule endoteliali, macrofagi e fibroblasti. L'adipogenesi è un processo altamente controllato, i cui eventi cellulari e molecolari sono stati ampiamente studiati negli ultimi anni, soprattutto grazie alla generazione di alcune linee cellulari, come ad esempio la linea preadipocitaria murina 3T3-L1 (Green H, Kehinde O, 1975), che hanno consentito la comprensione sia del differenziamento dei preadipociti in adipociti maturi, sia dei meccanismi alla base delle principali funzioni metaboliche della cellula, come lipolisi, incorporazione di glucosio insulino-mediato e lipogenesi. Dal punto di vista embriologico, il tessuto adiposo è considerato di origine mesodermica, anche

se non è chiaro con precisione quale delle sue componenti lo generi. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule multipotenti che, in seguito ad opportuna induzione, sono in grado di dare origine ad adipociti, osteoblasti, condrociti, mioblasti e tessuto connettivo. Non è ancora ben conosciuto quali siano gli esatti stati intermedi compresi tra mesoderma/cellule staminali mesenchimali e formazione di adipociti maturi. Tuttavia, si crede che il precursore staminale mesenchimale dia origine ad un precursore comune (adipoblasto), che prende poi la via di tessuto adiposo bianco o bruno. Inoltre, vista la condivisione di numerosi marcatori di differenziamento, non è chiaro se questo precursore possa realmente essere comune alle diverse tipologie di tessuto (bianco e bruno) e alle diverse localizzazioni (sottocutaneo e viscerale). Nell'adipogenesi si distinguono 4 fasi: blocco della crescita, espansione clonale, differenziamento precoce e differenziamento tardivo (Tang QQ, Lane MD, 2012, Ali AT et al., 2013). Queste fasi sono principalmente regolate dall'attivazione di una cascata trascrizionale che coinvolge il recettore nucleare attivato dai proliferatori perossisomiali, isoforma gamma (PPAR γ) e alcuni membri della famiglia delle proteine che si legano alla sequenza enhancer CCAAT (C/EBPs) (Rosen ED, MacDougald OA, 2006; Wu Z et al., 1999). PPAR γ è un importante regolatore dell'adipogenesi (Lefterova MI et al., 2014). E' stato, infatti, dimostrato che è necessario e sufficiente per la differenziazione cellulare (Tontonoz P, Spiegelman BM, 2008) e, ad oggi, non è stato identificato nessun fattore in grado di promuovere l'adipogenesi in assenza di PPAR γ . La realizzazione di dominanti negativi per il gene ha, inoltre, mostrato un ruolo anche nel mantenimento dello stato differenziativo, in quanto la sua soppressione determina la perdita della capacità di accumulo lipidico e la riduzione dei marcatori adipogenetici (Agostini M et al., 2006). Il PPAR γ è codificato dal gene PPARG (NR1C3), localizzato sul cromosoma 3. Esistono due isoforme di PPAR γ (PPAR γ 1 e PPAR γ 2), originate da uno splicing alternativo (Zhu Y et al. 1995), entrambe risultano essere espresse a livello del tessuto adiposo, ma solo la isoforma 2 costituisce un marcatore specifico del tessuto adiposo (Vidal-Puig A et al., 1996). Oltre alle capacità differenziative PPAR γ riveste un ruolo nel conferimento dell'insulino-sensibilità cellulare. I tre membri della famiglia c/EBP- α , - β e - δ sono i primi

fattori di trascrizione ad essere coinvolti nella differenziazione adipocitaria (Otto TC, Lane MD, 2005) e sono espressi in momenti specifici durante l'adipogenesi: i più precoci risultano essere la forma β e δ che, in concerto, promuovono l'espressione di $c/EBP\alpha$ e $PPAR\gamma$ (Lefterova MI et al., 2014). Modelli murini con soppressione di $c/EBP\beta$ e $c/EBP\delta$, singolarmente o associata, mantengono la capacità di generare tessuto adiposo, anche se l'efficienza con cui il fenomeno si verifica risulta essere ridotta e, sorprendentemente, esprimono livelli normali di $PPAR\gamma$, $c/EBP\alpha$ e della proteina legante gli acidi grassi (FABP4), a dispetto di una ridotta massa grassa totale, indicando che ci potrebbero essere meccanismi compensatori coinvolti nell'attivazione dei geni adipocitari (Tanaka T et al. 1997). Al contrario, $c/EBP\alpha$ è richiesto per il verificarsi di una normale adipogenesi. Topi con delezione di questo gene mostrano l'assenza di tessuto adiposo sottocutaneo, perirenale, ed epididimale, ma mostrano un normale sviluppo del tessuto adiposo a livello mammario, con ipertrofia del tessuto adiposo bruno (Linhart HG et al., 2001). Nonostante $PPAR\gamma$ e $c/EBP\alpha$ risultino entrambi necessari per la formazione del tessuto adiposo, il primo sembra rivestire un ruolo dominante: il "knocking down" di $c/EBP\alpha$ in fibroblasti embrionici murini può essere ripristinato dalla sovraespressione di $PPAR\gamma$, ma non si osserva invece l'evento in senso opposto (Rosen ED et al. 2002). Tuttavia, non è da escludere che le altre c/EBP possano compensare il "knocking down" di $c/EBP\alpha$. Ad esempio, è stato visto che $c/EBP\beta$ ha proprietà di "DNA-binding" analoghe a $C/EBP\alpha$ e rimane presente e trascrizionalmente attivo negli adipociti maturi (MacDougald OA et al., 1995), anche se la sua espressione è massima nelle fasi iniziali dell'adipogenesi quando promuove l'espressione di $PPAR\gamma$ e di $c/EBP\alpha$ (Farmer SR. 2006). Questi risultati indicano che le C/EBP , così come $PPAR\gamma$, hanno un ruolo cruciale nella regolazione della trascrizione dei geni adipocitari (Figura 1), anche se l'esatto meccanismo molecolare attraverso il quale $PPAR\gamma$ e le $c/EBPs$ cooperano è ancora da chiarire. Il solo marcatore universalmente accettato per identificare i preadipociti, ovvero i precursori indifferenziati ma commissionati a maturare in adipociti, risulta essere il fattore preadipocitario 1 (Pref-1), la cui espressione è molto elevata sia nei preadipociti bianchi che bruni e viene enormemente ridotta con l'avanzare del

differenziamento (Kim KA et al., 2007). Pref-1 deriva dalla famiglia Notch/Delta/Serrate, viene sintetizzato inizialmente come proteina transmembrana e poi successivamente processato fino a dare una proteina solubile che agisce come inibitore dell'attività del PPAR γ e quindi dell'adipogenesi. Per questo motivo la repressione dei livelli di Pref-1 rappresenta lo step primario del processo differenziativo da preadipocita ad adipocita maturo. Infatti, l'over-espressione della proteina Pref-1 in animali da esperimento ha mostrato una riduzione dell'adipogenesi, mentre la sua soppressione ha dimostrato un accumulo di tessuto adiposo (Moon YS et al., 2002). L'adipogenesi possiede anche una regolazione negativa, mediata principalmente da alcuni componenti della famiglia di Wnt (Laudes M, 2011; Tang QQ, Lane MD, 2012). La "pathway" canonica di Wnt è una via di segnalazione extracellulare che controlla la proliferazione, la sopravvivenza e il destino differenziativo delle cellule staminali mesenchimali verso l'osteogenesi, la miogenesi o l'adipogenesi (Figura 2). I ligandi Wnt sono glicoproteine secrete che funzionano in maniera paracrina e autocrina legandosi ai recettori di membrana di tipo frizzled (FZD) e ai corecettori 5 e 6 correlati ai recettori per le lipoproteine a bassa densità (LRP5/6). L'attivazione di tali recettori determina l'inibizione intracellulare dell'enzima glicogeno sintasi chinasi 3- β (GSK3 β) e la relativa mancata fosforilazione della β -catenina. Quest'ultima, nella sua forma non fosforilata, non viene indirizzata verso la degradazione proteosomale, si accumula nel citoplasma e, infine, trasloca nel nucleo dove interagisce con fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia del fattore di trascrizione specifico per le cellule T e del fattore di trascrizione legante la sequenza enhancer linfoide (TCF/LEF) (Logan CY, Nusse R, 2004) determinando la trascrizione dei geni target di Wnt. Finora, sono stati individuati 19 ligandi Wnt (Miller JR, 2002; Willert K et al., 2003), e tra questi, Wnt10b è il Wnt endogeno che, molto probabilmente, è implicato nell'inibizione dell'adipogenesi. Wnt10b è altamente espresso nelle cellule stromali del tessuto adiposo, e la sua espressione diminuisce rapidamente dopo l'inizio dell'adipogenesi (Ross SE et al., 2000). L'inibizione del signalling di Wnt è un prerequisito fondamentale per la differenziazione dei preadipociti umani e dei preadipociti murini 3T3-L1, attraverso l'induzione di PPAR γ e

C/EBP α (Gustafson B, Smith UJ, 2006; Kennell JA, MacDougald OA, 2005). L'overespressione di Wnt10b nei topi ha mostrato una riduzione del tessuto adiposo del 50% e, inoltre, questi topi erano resistenti all'obesità dieta-indotta (Wright WS et al., 2007). L'inibizione del segnale Wnt causa il differenziamento spontaneo dei preadipociti, e topi "knock-out" per Wnt10b mostrano un incremento del potenziale adipogenico nei mioblasti (Vertino AM et al., 2005). Al contrario, l'attivazione costitutiva del segnale Wnt promuove la miogenesi e l'osteogenesi. Una molecola importante coinvolta nell'inibizione di Wnt e nell'induzione adipogenica delle cellule staminali mesenchimali è Dickkopf (DKK)1 (Christodoulides C et al., 2006). DKK1 è una proteina secreta che si lega ad alta affinità ai corecettori LRP5/6 determinando una riduzione dei livelli di β -catenina fosforilata con conseguente induzione adipogenica (Gustafson B et al., 2010). L'espressione del gene DKK1 e della relativa proteina è indotta transitoriamente durante la differenziazione dei preadipociti umani, ed è stato dimostrato che l'espressione costitutiva di DKK1 in cellule 3T3-L1 blocca il signalling Wnt/ β -catenina e promuove l'adipogenesi (Christodoulides C et al., 2006). Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che mutazioni attivanti LRP5 inibiscono la differenziazione adipogenica di MSC umane (Ai M et al., 2005), mentre mutazioni inattivanti LRP5 esercitano l'effetto opposto (Qiu W et al., 2007). Recenti studi hanno dimostrato che le cicline di tipo D sono molecole coinvolte non solo nella regolazione del ciclo cellulare, ma anche in altri processi cellulari, quali il differenziamento, funzionando come cofattori per diversi fattori di trascrizione. E' stato, infatti, riportato che la ciclina D1 è in grado di inibire la differenziazione degli adipociti, attraverso la repressione dell'espressione e della transattivazione di PPAR γ (Wang C et al., 2003) e di c/EBP β (Lamb J et al. 2003), mentre la ciclina D3 è in grado di promuovere la differenziazione degli adipociti, in quanto agisce come co-attivatore di PPAR γ (Sarruf DA et al., 2005). Hishida e collaboratori, in un loro lavoro sul ruolo delle cicline D, affermano che la prevalente espressione di ciclina D3 rispetto alla ciclina D1 viene considerata un marker di differenziazione adipogenica (Hishida T et al., 2008). Una volta indotto lo stimolo differenziativo le cellule sono sottoposte a profondi cambiamenti morfologici e trascrizionali. A livello morfologico si verifica il

passaggio dalla forma allungata dei fibroblasti a quella sferica, tipica degli adipociti. Le modificazioni morfologiche sono, poi, accompagnate da riarrangiamenti a livello del citoscheletro e della matrice extracellulare (Gregoire FM et al., 1998). La fase terminale del differenziamento è caratterizzata dall'attivazione della cascata trascrizionale che porta all'espressione di importanti proteine coinvolte nella sintesi dei trigliceridi, nell'acquisizione della sensibilità insulinica e nella produzione di proteine che caratterizzano gli adipociti come maturi. La capacità di induzione di marcatori adipogenetici tardivi è prevalentemente regolata da PPAR γ e C/EBP α . Viene, inoltre, aumentata la produzione di proteine coinvolte nel metabolismo dei trigliceridi come ad esempio enzima malico, acetil CoA carbossilasi, stearoil CoA desaturasi, acido grasso sintasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi e fosfoenolpiruvato carbossichinasi. Durante l'adipogenesi si osserva, inoltre, l'incremento della sensibilità insulinica attraverso l'aumentata sintesi del suo recettore e del trasportatore per il glucosio insulino-dipendente (GLUT4) e una trascrizione elevata dei geni che codificano per FABP4, una proteina in grado di legare acidi grassi, per il trasportatore 1 per gli acidi grassi (FATP-1), che codifica per un trasportatore degli acidi grassi e per LPL, coinvolta nello "storage" e nel controllo del metabolismo lipidico (Fajas L et al., 1998). Il raggiungimento del fenotipo maturo è correlato anche all'acquisizione della capacità endocrina del tessuto adiposo, capace di secernere molecole, chiamate adipochine, ad azione sia autocrina che paracrina, che partecipano alla regolazione dell'omeostasi energetica (Gregoire FM et al., 1998).

Le adipochine

Le adipochine includono ormoni, come leptina, adiponectina, visfatina, resistina, e citochine infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), la proteina 1 di chemiotassi dei monociti (MCP-1) e l'interleuchina-6 (IL-6).

La *leptina* (dal greco lepthos, cioè magro) è un ormone di 16 kDa formato da 167 amminoacidi (Cohen SL et al., 1996) e codificato dal gene ob, localizzato sul cromosoma 6 nel topo e sul cromosoma 7 nell'uomo (Zhang Y et al.,

1994). La leptina agisce attraverso l'interazione con il suo recettore transmembrana (OB-R), il quale mostra una notevole somiglianza strutturale con i recettori delle citochine di classe I (Tartaglia LA et al., 1995). La leptina è secreta quasi esclusivamente dagli adipociti, in proporzione alla massa grassa, e svolge il ruolo di segnalare all'ipotalamo la presenza di sufficienti riserve di energia (Zhang Y et al., 1994; Banks WA, 2004; Unger RH, 2004; Maffei M et al., 1995; Friedman JM, Halaas JL, 1998; Ahima RS, Flier JS, 2000), regolando in tal modo il fabbisogno alimentare. Tuttavia essa è prodotta, in minima parte, anche dalla placenta, dall'epitelio mammario, dalla mucosa gastrica, dal midollo osseo, dal muscolo scheletrico, dall'ipotalamo e dalle ossa (Masuzaki H et al., 1997; Bado A et al., 1998; Wilkinson M et al., 2000). La leptina circola nel plasma come peptide libero o associato ad altre proteine plasmatiche (Horn R et al., 1996; Houseknecht KL et al., 1996; Lammert A et al., 2001) e non è rilevabile nel plasma del mutante obeso ob/ob (Halaas JL et al., 1995). In questi animali, infatti, è stata caratterizzata una trascrizione non senso al codone 105 del gene ob, che causa la produzione di un peptide tronco non funzionante (Zhang Y et al., 1994). Il fenotipo fortemente obeso del topo ob/ob, è dunque la conseguenza dell'incapacità di produrre leptina circolante. Tra i modelli murini di obesità ereditaria, i mutanti ob/ob e quelli con una mutazione del gene che codifica per il recettore della leptina (db/db), presentano un fenotipo identico, caratterizzato dallo sviluppo estremamente precoce di una forte obesità. Le disfunzioni metaboliche tipiche di questo modello sono: la costante ricerca di cibo, la sostanziale depressione delle attività motorie spontanee e un grave ritardo dello sviluppo del sistema riproduttivo (Friedman JM et al., 1991; Ravussin E, 2002; Unger RH, 2004). Le funzioni svolte dalla leptina non si esauriscono a livello ipotalamico e non riguardano esclusivamente il mantenimento dell'omeostasi energetica (Baratta M, 2002), ma coinvolgono tutto il sistema nervoso centrale e periferico (Frühbeck G, 2001; Frühbeck G, 2002; Bjørbaeck C, Kahn BB, 2004). La leptina, infatti, è coinvolta in numerosi processi fisiologici quali: la regolazione del metabolismo, la crescita, lo sviluppo, la regolazione di alcuni processi endocrinologici ed immunologici, la riproduzione, la fisiopatologia cardiovascolare e il mantenimento della funzione respiratoria (Gainsford T et

al., 1996; Sierra-Honigmann MR et al., 1998; La Cava A, Matarese G, 2004). Per quanto riguarda la riproduzione, è stato dimostrato che il deficit congenito di leptina è associato a ipogonadismo ipogonadotropo e a infertilità e che tale deficit viene revertito dal trattamento con leptina endogena (Gamba M, Pralong FP, 2006).

L'*adiponectina*, chiamata anche Acrp30, apM1, adipoQ e GBP28 (Scherer PE et al., 1995; Maeda K et al., 1996; Hu E et al., 1996; Nakano Y et al., 1996), è una proteina di 247 amminoacidi isolata per la prima volta nel 1995 dal tessuto adiposo (Scherer PE et al., 1995). L'adiponectina è sintetizzata principalmente dagli adipociti, ma è espressa anche dalle cellule del muscolo scheletrico, dai miociti cardiaci e dalle cellule muscolari (Piñeiro R et al., 2005; Delaigle AM et al., 2004; Wolf AM et al., 2006). I suoi recettori sono AdipoR1 e AdipoR2, che sono prevalentemente espressi nel muscolo e nel fegato (Kadowaki T et al., 2005). In condizioni fisiologiche l'adiponectina è presente nel sangue a concentrazioni elevate (5-10 µg/ml); mentre nei soggetti obesi, in quelli con diabete mellito di tipo 2 e in quelli affetti da malattie cardiovascolari i livelli circolanti di adiponectina sono ridotti. Al contrario, la perdita di peso determina un significativo aumento della produzione di adiponectina (Inadera H, 2008). Numerosi studi hanno dimostrato che l'adiponectina potrebbe essere una adipochina insulino-sensibilizzante (Kadowaki T et al., 2005; Kubota N et al., 2002; Nawrocki AR et al., 2006; Ma K et al., 2002). I recettori per l'adiponectina, legando questo ormone, attivano la protein chinasi attivata da AMP (AMPK), con conseguente inibizione della gluconeogenesi nel fegato e stimolazione dell'ossidazione degli acidi grassi liberi nel muscolo scheletrico e nel fegato. L'adiponectina agisce anche attraverso l'attivazione di PPAR α e PPAR γ stimolando l'ossidazione degli acidi grassi liberi e la diminuzione del contenuto tissutale di trigliceridi nel muscolo e nel fegato (Kadowaki T et al., 2005). Inoltre, l'adiponectina ha un effetto diretto sull'uptake di glucosio nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo attraverso un'augmentata traslocazione di GLUT4 sulla membrana plasmatica (Ceddia RB et al., 2005; Fu Y et al., 2005).

La *resistina* è una adipochina che è stata scoperta da tre gruppi indipendenti (Holcomb IN et al., 2000; Steppan CM et al., 2001; Kim KH et al., 2001). Chiamata anche FIZZ3, la resistina è un polipeptide di 114 aminoacidi che, originariamente, ha dimostrato la capacità di indurre insulino-resistenza nei topi (Steppan CM et al., 2001). Appartiene a una famiglia di proteine ricche di cisteina, note anche come molecole resistina-like (RELMs), che sono implicate nella regolazione dei processi infiammatori (Holcomb IN et al., 2000). La resistina si trova in circolo in due forme distinte: un esamero ad alto peso molecolare molto diffuso e un complesso a basso peso molecolare più bioattivo ma meno diffuso (Patel SD et al., 2004). L'espressione del gene che codifica per la resistina è stata trovata in diversi tessuti, tra cui il tessuto adiposo, l'ipotalamo, le ghiandole surrenali, la milza, il muscolo scheletrico, il pancreas e il tratto gastrointestinale, sia nei topi che nell'uomo (Kusminski CM et al., 2005). Tuttavia, nel topo la sintesi proteica di resistina sembra avvenire solo negli adipociti, mentre nell'uomo diversi tipi cellulari, come adipociti, cellule muscolari, cellule pancreatiche e quelle mononucleate, sono in grado di sintetizzare questa proteina. I livelli di espressione del gene codificante per la resistina sono più elevati nelle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) che negli adipociti, tuttavia, gli studi comparativi della proteina non sono disponibili (Kusminski CM et al., 2005). Quindi, resta ancora da dimostrare quale tipo cellulare negli esseri umani sia il principale responsabile della produzione sistemica e degli alti livelli circolanti di resistina. Sorprendentemente, a livello proteico, la resistina umana è solo per il 55% identica alla sua controparte nel topo, questo indica che la resistina potrebbe non essere evolutivamente ben conservata tra le specie. Nelle cellule mononucleate di sangue periferico umane, l'espressione dell'mRNA della resistina è aumentata notevolmente dalle citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-6 e TNF, e da LPS, al contrario, interferone gamma (IFN γ) e leptina non determinano alcun effetto (Kaser S et al., 2003). Allo stesso modo, la stimolazione di macrofagi umani con LPS porta ad un'aumentata espressione del mRNA della resistina, e la somministrazione di LPS negli esseri umani determina un notevole aumento dei livelli di resistina nel siero (Lehrke M et al., 2004). L'induzione della sintesi di resistina può essere attenuata dagli

agonisti di PPAR γ (Kusminski CM et al., 2005; Lehrke M et al., 2004); è stato infatti dimostrato che il trattamento di pazienti con diabete mellito di tipo 2 con pioglitazone, un agonista PPAR γ , determina una diminuzione dei livelli sierici di resistina (Bajaj M et al., 2004). Inoltre, diversi fattori, quali gli ormoni ipofisari, steroidei e tiroidei, l'adrenalina, l'attivazione del recettore β 3-adrenergico, l'endotelina-1 e l'insulina modulano l'espressione della resistina (Kusminski CM et al., 2005; Lehrke M et al., 2004). E' stato, infine, osservato che la resistina, negli esseri umani, presenta molte caratteristiche tipiche delle citochine infiammatorie e quindi potrebbe avere un ruolo nelle malattie infiammatorie associate o meno a insulino-resistenza (Jung HS et al., 2006; Kawanami D et al., 2004).

La *visfatina* è stata recentemente identificata come una adipochina, secreta dagli adipociti del grasso viscerale, capace di ridurre l'insulino-resistenza (Fukuhara A et al., 2005). Questa molecola si lega e attiva il recettore dell'insulina, ma non è in concorrenza con l'insulina, infatti le due molecole interagiscono con il recettore dell'insulina in due siti diversi. La visfatina è stata identificata più di 10 anni fa come fattore di crescita delle colonie di cellule pre-B (PBEF) e, da allora, è stata associata a diversi stati di malattia infiammatoria come, ad esempio, danno polmonare acuto (Samal B et al., 1994; Ye SQ et al., 2005). Jia e collaboratori hanno dimostrato che la visfatina è upregolata nei neutrofili attivati e che è capace di inibire l'apoptosi dei neutrofili (Jia SH et al., 2004).

Come introdotto in precedenza, gli adipociti sono in grado di secernere *citochine infiammatorie* la cui produzione aumenta in caso di eccessivo accumulo di tessuto adiposo e tale aumento sembra essere coinvolto nell'insulino-resistenza correlata all'obesità (Kern PA et al., 2001). Infatti, l'aumento delle dimensioni degli adipociti, tipico dell'obesità determina, negli adipociti e nel tessuto adiposo, uno stato di infiammazione cronica con una diminuzione della secrezione di adiponectina e un aumento della secrezione delle citochine proinfiammatorie, come IL-6, TNF α e MCP-1. E' stato dimostrato che il tessuto adiposo è un'importante fonte di IL-6 e che i suoi livelli circolanti sono correlati con l'indice di massa corporea (BMI) e con la

dimensione degli adipociti (Sopasakis VR et al., 2004). TNF α e IL-6 sono noti per promuovere la lipolisi e la secrezione di acidi grassi liberi, che contribuiscono a un aumento della produzione epatica di glucosio e all'insulino-resistenza quando i loro livelli sono elevati (Hotamisligil GS et al., 1995). A differenza dell'IL-6, il TNF α non è secreto solo dagli adipociti, ma principalmente dai macrofagi infiltrati nel tessuto adiposo, e funziona come un fattore paracrino e/o autocrino (Mohamed-Ali V et al., 1997; Xu H et al., 2002). Nel tessuto adiposo ci sono due tipi di macrofagi: i macrofagi residenti/tissutali e i macrofagi infiammatori. I macrofagi residenti hanno bassi livelli di produzione di citochine proinfiammatorie, ma possono essere attivati in seguito a un maggiore reclutamento e a una maggiore attivazione dei monociti del sangue (Curat CA et al., 2004; Bai Y, Sun Q, 2015). L'infiltrazione dei monociti/macrofagi nel tessuto adiposo inizia, probabilmente, con l'aumento delle dimensioni degli adipociti, che è associato con un aumento dello stress fisico e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e con una maggiore secrezione di acidi grassi liberi e di citochine infiammatorie (Isakson P et al., 2009; Takahashi K et al., 2003). Di queste citochine, MCP-1, secreta dai macrofagi e dagli adipociti stessi (Xu H et al., 2003), sembra essere la più importante (Takahashi K et al., 2003) ed ha la funzione, insieme alle altre citochine, di reclutare, una volta rilasciate in circolo, i monociti attivati nel tessuto adiposo (Lumeng CN et al., 2007, Curat CA et al., 2004). E' stato ipotizzato che, una volta nel tessuto adiposo, i monociti differenziano in macrofagi infiammatori rilasciando il TNF α , che induce ulteriormente l'infiammazione negli adipociti e il reclutamento dei macrofagi, determinando così un circolo vizioso. Nei soggetti gravemente obesi, il numero dei macrofagi è più alto nel grasso viscerale che nel grasso sottocutaneo (Tchoukalova YD et al., 2004), e questo è coerente con il fatto che il grasso viscerale svolge un ruolo più importante nell'insulino-resistenza (Cancello R et al., 2005; Bai Y, Sun Q, 2015)

Adipociti, bilancio energetico e disfunzione del tessuto adiposo

Il bilancio energetico negli animali è regolato dalla prima legge della termodinamica, e può essere riassunto in maniera semplice dalla seguente equazione:

$$\text{introito energetico} = \text{energia consumata} + \text{energia conservata}$$

L'accumulo lipidico nel tessuto adiposo rappresenta un eccesso di energia introdotta rispetto a quella consumata, e altera il semplice sistema fisiologico che è stato introdotto in precedenza. Tuttavia, non è facile valutare la spesa energetica, in quanto non esistono precisi parametri per valutare alcuni sistemi, come ad esempio l'efficienza di assorbimento delle calorie a livello dello stomaco. L'organismo inoltre non risponde in maniera statica alla variazione dell'introito calorico o del dispendio energetico. Per cui risulta evidente che il bilancio energetico è regolato da diversi fattori, come ormoni, impulsi neuronali, fattori psicologici e culturali. In generale la cellula del tessuto adiposo bianco svolge un ruolo chiave nel mantenimento di questo bilancio energetico, riuscendo ad integrare numerosi tipi di segnali, di origine endocrina e non (Abizaid A et al., 2006). Il glucosio è la principale fonte di energia utilizzata nel regno animale e nel tempo si sono evoluti molteplici meccanismi che ne regolano il metabolismo, la sintesi e il suo immagazzinamento. Il livello di glucosio plasmatico viene finemente regolato per consentire alle cellule l'accesso costante al nutrimento e per evitarne la tossicità: questo mantiene nell'uomo i suoi livelli compresi tra 4 e 7 mM. L'insulina regola l'omeostasi del glucosio riducendo la produzione endogena di glucosio epatico attraverso l'inibizione della gluconeogenesi e della glicogenolisi e aumentando la captazione del glucosio da parte dei tessuti periferici, soprattutto a livello del tessuto muscolare e del tessuto adiposo. L'insulina svolge un ruolo anche nel controllo del metabolismo lipidico: aumenta la sintesi di lipidi nel fegato e nelle cellule adipose e diminuisce il rilascio di acidi grassi presenti a livello del tessuto adiposo e muscolare. Tale ormone stimola, infatti, la sintesi degli acidi grassi, l'utilizzo di quelli a lunga catena, la sintesi dei trigliceridi (lipogenesi) e l'attività della lipoprotein-lipasi. L'insulino-sensibilità di una cellula, di un tessuto o di un organismo definisce la capacità di promuovere l'assorbimento

cellulare di glucosio mediata dall'insulina, di conseguenza l'insulino-resistenza fa riferimento ad una ridotta capacità dell'insulina nella promozione di questo evento. Uno stato di ridotta sensibilità all'insulina è spesso associata a stati patologici quali la sindrome metabolica, l'obesità e il diabete mellito di tipo 2. L'accumulo di grasso viscerale in eccesso può essere dovuto alle caratteristiche dell'insulino-resistenza, ma potrebbe anche essere un indicatore di un tessuto adiposo sottocutaneo disfunzionante che non è in grado di immagazzinare correttamente l'eccesso di energia. Secondo questo modello, la capacità del corpo di far fronte ad un surplus di calorie (derivanti da un elevato introito calorico o da una vita sedentaria o, come spesso accade, da una combinazione di entrambi i fattori) potrebbe, in ultima analisi, determinare la suscettibilità individuale a sviluppare la sindrome metabolica. Ci sono prove che suggeriscono che se l'energia in eccesso viene immagazzinata nel tessuto adiposo sottocutaneo insulino-sensibile, l'individuo, anche se presenta un bilancio energetico positivo, è protetto contro lo sviluppo della sindrome metabolica. Al contrario, nei casi in cui il tessuto adiposo sottocutaneo è assente, carente o insulino-resistente, con una limitata capacità di immagazzinare l'eccesso di energia, quindi disfunzionante, il surplus di triacilgliceroli si depositerà in siti indesiderati come il fegato, il cuore, il muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo viscerale - un fenomeno descritto come deposizione ectopica del grasso (Depres JP, Lemieux I, 2006; Tchernof A, Després JP, 2013; Blüher M, 2013) A tutto questo si associano altri fenomeni, quali l'ipertrofia degli adipociti, la presenza di ipossia nel tessuto adiposo, l'autofagia e l'infiammazione (Blüher M, 2013; Fig. 3), che concorrono tutti insieme a determinare la disfunzione del tessuto adiposo. I fattori associati all'accumulo di grasso viscerale e alle caratteristiche di insulino-resistenza sono, tra gli altri, il fumo, la ben documentata suscettibilità genetica all'obesità viscerale (Bouchard C et al., 1990) e un profilo neuroendocrino connesso a una risposta disadattativa allo stress (Björntorp P, 1991). Le conseguenze metaboliche di questo "difetto" nella partizione dell'energia sono l'obesità viscerale, l'insulino-resistenza, una dislipidemia aterogena e un profilo infiammatorio pro-trombotico: caratteristiche tipiche della sindrome metabolica (Figura 4).

Sindrome metabolica

La Sindrome Metabolica (SM) rappresenta una patologia, costituita da un insieme di alterazioni metaboliche associate a uno stato di insulino-resistenza e a un aumentato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari (PCV) e metaboliche. Nonostante attualmente non vi sia una definizione universalmente accettata di SM e vi siano differenze nei criteri utilizzati per la diagnosi, sono tre le definizioni più comunemente riconosciute, come quella suggerita dalla “World Health Organisation” (WHO), dallo “European Group for the Study of Insulin Resistance” (EGIR) e dal “National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel” (NCEP ATP III). L’organizzazione mondiale della sanità (WHO) definisce la SM come presenza di diabete mellito, alterata glicemia a digiuno, ridotta tolleranza al glucosio o insulino resistenza in associazione a due dei seguenti fattori:

- dislipidemia (trigliceridi 150 mg/dL e/o HDL < 35 mg/dL nei maschi e < 39 mg/dL nelle femmine);
- elevata pressione arteriosa con livelli 140/90 mmHg e/o in terapia antipertensiva;
- obesità (BMI > 30 kg/m² e/o WHR > 0,90 nei maschi, e > 0,85 nelle femmine);
- microalbuminuria 20 µg/min o rapporto albumina/creatinina 30 mg/g (World Health Organization. 1999).

Il documento sottolinea che manifestazioni della SM possono essere presenti fino a dieci anni prima che i disordini glicemici vengano rilevati e che la SM con normale tolleranza glucidica identifica il soggetto come appartenente a un gruppo a elevatissimo rischio di sviluppare diabete in futuro. Il Gruppo di Studio Europeo dell’Insulino resistenza (EGIR) ha criticato quanto proposto dagli esperti della WHO e ha indicato criteri alternativi proponendo la definizione classica di «sindrome dell’insulino resistenza» al fine di evitare sovrapposizioni con il diabete e di semplificare le procedure diagnostiche. Infatti, per l’EGIR tale sindrome è definita dalla presenza d’insulino-resistenza

o iperinsulinemia (solo in soggetti non diabetici) e almeno due dei seguenti fattori:

- glicemia a digiuno $> 6,1$ mmol/L;
- dislipidemia (trigliceridi > 2 mmol/L e/o HDL < 1 mmol/L o trattati per dislipidemia);
- ipertensione (valori pressori $> 140/90$ mmHg e/o in terapia);
- obesità centrale (circonferenza vita > 94 cm nei maschi, > 80 cm nelle femmine) (Ferrannini E et al., 1997).

Nel 2001, il “United States National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) report” ha suggerito per la prima volta dei criteri diagnostici: é stato proposto che la presenza di tre o più dei seguenti disordini nello stesso paziente sia sufficiente per identificare la SM:

- un’obesità addominale quantificabile con una circonferenza della vita superiore ai 102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne;
- un aumento dei valori dei trigliceridi (≥ 150 mg/dl);
- bassi livelli di colesterolo HDL (C-HDL o colesterolo buono), vale a dire < 40 mg/dL per gli uomini e < 50 mg/dL per le donne;
- ipertensione, con valori $\geq 130/85$ mmHg o documentato uso di farmaci antipertensivi;
- aumento della glicemia a digiuno ≥ 110 mg/dL (Third report of the national cholesterol education program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report Circulation, 106: 3143-421, 2002).

L’ATP III identifica, quindi, 5 componenti della SM, che definisce come fattori di rischio “di base”, “maggiori” ed “emergenti”, intendendo come fattori “di base” l’obesità, l’inattività fisica ed una dieta aterogenica; quelli “maggiori” fumo, ipertensione, elevati livelli di LDL, anamnesi familiare per malattia

cardiaca precoce ed invecchiamento; quelli “emergenti” l’ipertrigliceridemia, l’aumento delle LDL, l’insulino-resistenza, l’intolleranza glicemica, lo stato proinfiammatorio e protrombotico. Nonostante l’apparente favore incontrato, nemmeno questa definizione è stata, da tutti, accettata: ad esempio, l’American College of Endocrinology ribadisce l’importanza di utilizzare ancora il termine «sindrome da insulino resistenza» che comprende le conseguenze dell’insulino resistenza e dell’iperinsulinemia compensatoria. Secondo l’American College of Endocrinology per l’identificazione della sindrome devono essere presenti 2 delle 4 seguenti anomalie:

- trigliceridi > 150 mg/dL;
- colesterolo HDL < 40 mg/dL nell’uomo ed < 50 mg/dL nella donna;
- pressione >130/85 mm Hg;
- glicemia a digiuno 110-125 mg/dL ; glicemia 120 min dopo carico orale di 75 g di glucosio 140-200 mg/dL (American college of endocrinology. ACE Position Statement on the insulin resistance syndrome. Endocrine Practice, 9: 240-52, 2003).

Le difficoltà, incontrate fino ad oggi, nel trovare accordo su una definizione condivisa sono legate ai molteplici fenotipi clinici di presentazione della sindrome e a quadri clinici che possono cambiare nel tempo, in relazione anche a fenomeni parafisiologici come l’invecchiamento e la menopausa. Nonostante ciò è opportuno ricordare due dati di fatto:

- i singoli componenti della sindrome correlano con l’aumentato rischio di cardiopatia ischemica;
- la circonferenza vita è uno dei migliori predittori di SM (Palaniappan L et al., 2004).

Sindrome metabolica e ipogonadismo

SM, ipogonadismo, disfunzione erettile (DE), adiposità viscerale e insulino resistenza spesso coesistono nello stesso soggetto. Questo gruppo di anomalie è

associato a un aumentato rischio per il maschio di malattie diabetiche e PCV, che influisce non solo sulla qualità ma anche sull'aspettativa di vita. L'obesità viscerale molto probabilmente può essere considerata una rilevante causa di ipogonadismo; ma allo stesso tempo, l'ipogonadismo può essere causa di obesità e insulino resistenza con l'insorgenza di un circolo vizioso e conseguenti difficoltà nello stabilire una chiara relazione causa-effetto. Un'associazione tra SM e ipogonadismo è emersa anche in soggetti che presentano disturbi sessuali (Corona G et al., 2006a; Corona G 2007a; Corona G et al., 2007b; Corona G et al., 2008a; Guay A, Jacobson J, 2007; Traish AM et al., 2008; Svartberg J, 2007). Studi trasversali hanno dimostrato come la SM sia associata ad un aumento di incidenza della disfunzione sessuale, essenzialmente caratterizzata da una peggiore funzione erettile dovuta all'indebolimento del flusso sanguigno del pene (Corona G et al., 2008a, Gündüz MI et al., 2004; Bansal TC et al., 2005; Esposito K et al., 2005; Demir T et al., 2006; Bal K et al., 2007; Paick JS et al., 2007). Questa osservazione non è sorprendente: infatti, sebbene l'insulina a concentrazioni fisiologiche in soggetti sani eserciti un'azione vasodilatante, associata ad un aumento della distensibilità vascolare, questo effetto benefico è indebolito negli stati di insulino resistenza come nella SM (Stehouwer CD et al., 2008). Studi sperimentali hanno mostrato che l'insulina, a livello endoteliale stimola la sintesi di mediatori sia ad azione vasocostrittoria (endotelina-1) che vasodilatante (monossido di azoto, NO). Mentre in soggetti con normale sensibilità insulinica prevale l'effetto vasodilatante, negli individui insulino resistenti la produzione di monossido di azoto indotta dall'insulina è compromessa, mentre quella di endotelina-1 è conservata (Stehouwer CD et al., 2008). Inoltre, gli stati di insulino resistenza sono associati alla presenza di arteriosclerosi, la quale potrebbe danneggiare le arterie del pene con conseguente riduzione del flusso sanguigno. Dati ottenuti dallo studio longitudinale del "Massachusetts Male Aging Study" (MMAS) hanno dimostrato come la DE possa essere considerata un fattore predittivo di SM in uomini normopeso (Kupelian V et al., 2006). Quindi, la DE può rappresentare un segno precoce di SM. Inoltre, la DE è spesso associata con ipogonadismo (Wang C et al., 2008). Pazienti con disfunzione sessuale costituiscono una

popolazione con elevata prevalenza di ipogonadismo e rappresentano un buon modello per lo studio dell'ipogonadismo associato alla SM (Corona G et al., 2008a, Morelli A et al., 2007; Shabsigh R et al., 2008). Come dimostrato dalla nostra unità di ricerca, la prevalenza di ipogonadismo aumenta in funzione del numero dei componenti di SM: l'elevata circonferenza vita e l'ipertrigliceridemia sono i più importanti determinanti dell'ipogonadismo (T totale < 10.4 nmol/L) associato a SM. Quindi i soggetti con ipogonadismo associato a SM rappresentano un fenotipo caratterizzato da ipertrigliceridemia ed elevata circonferenza vita. Inoltre, sia il T legato che quello non legato alla proteina legante gli ormoni sessuali, SHBG (Sex Hormone Binding Globuline), diminuiscono in funzione dei componenti della SM. Invece, i sintomi connessi all'ipogonadismo, valutati attraverso l'intervista strutturata ANDROTEST, hanno dimostrato una tendenza inversa, dimostrando la presenza di un ipogonadismo franco associato a SM (Corona G et al., 2006b).

È interessante notare che l'associazione tra SM e la diminuzione di T non è compensata da un aumento di LH a livello della ghiandola ipofisaria, suggerendo l'assenza di un meccanismo compensatorio determinato dalla secrezione delle gonadotropine. Recentemente è stata dimostrata una forte relazione inversa tra T non legato a SHBG e pressione differenziale (PD, Corona G et al., 2008b). La PD è la differenza aritmetica tra la pressione sanguigna sistolica e diastolica e riflette la rigidità arteriosa, altro indice di insulino resistenza (Corona G et al., 2008b). E' interessante notare che valori elevati di PD sono associati ad un maggior rischio cardiovascolare, anche dopo correzioni per i valori di pressione arteriosa media (Mannucci E et al., 2006; Mannucci E et al., 2007). Sia i dati ottenuti con modelli animali che quelli ottenuti da studi epidemiologici suggeriscono che il T giochi un ruolo cruciale nella regolazione dell'insulino sensibilità. Studi prospettici hanno dimostrato chiaramente che bassi livelli di T potrebbero presagire lo sviluppo di diabete mellito di tipo 2 o di SM (Corona G et al., 2008a; Traish AM et al., 2008; Svartberg J, 2007; Ding EL et al., 2006; Haffner SM et al., 1996; Tibblin G et al., 1996; Stellato RK et al., 2000; Oh JY et al., 2002; Laaksonen DE et al., 2004; Kupelian V et al., 2006). Inoltre, è stato anche riportato che il diabete di

tipo 2 e la SM sono in grado di predire lo sviluppo di ipogonadismo maschile (Laaksonen DE et al., 2005; Derby CA et al., 2006; Rodriguez A et al., 2007). Pitteloud e collaboratori hanno dimostrato che i livelli di T sono positivamente correlati con l'insulino sensibilità, misurata con il "clamp iperinsulinemico euglicemico" indipendentemente dalla composizione corporea (Pitteloud N et al., 2005). Risultati simili sono stati riportati da Muller e collaboratori (Muller M et al., 2005). Yialamas e collaboratori hanno recentemente dimostrato che la sospensione improvvisa della terapia sostitutiva con T è associata ad un'insufficiente sensibilità all'insulina senza osservare cambiamenti della composizione corporea (Yialamas MA et al., 2007). In accordo, studi condotti su soggetti sottoposti a soppressione androgenica a lungo termine (≥ 12 mesi) per il cancro della prostata rivelano una maggiore prevalenza di diabete mellito e SM, oltre a una maggiore mortalità per eventi cardiovascolari (Basaria S, 2008). Dall'altro lato, il trattamento con T di soggetti diabetici ipogonadici migliora l'insulino resistenza, anche se paragonati ad un numero limitato di pazienti di controllo (Boyanov MA et al., 2003; Kapoor D et al., 2006; Kapoor D et al., 2007; Saad F et al., 2008). Perciò, le linee guida attuali non suggeriscono una terapia sostitutiva con T in soggetti con SM o diabete mellito in assenza di evidenze cliniche di ipogonadismo (Wang C et al., 2008). Risultati analoghi sono stati ottenuti su modelli animali: Lin e collaboratori hanno dimostrato che topi di sesso maschile "knock out" per il recettore androgenico (ARKO) sono caratterizzati da una progressiva riduzione della sensibilità all'insulina e da una ridotta tolleranza al glucosio, che progredisce con l'età (Lin HY et al., 2008). Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che la delezione specifica del recettore androgenico (AR) a livello epatico è associata allo sviluppo di insulino-resistenza e steatosi epatica nei maschi ma non nelle femmine di topo, suggerendo un differente ruolo tessuto specifico di AR nei maschi (Lin HY et al., 2008; Yu IC et al., 2008). Infine, l'insulina può direttamente agire sull'ipotalamo, inducendo l'aumento della sintesi e del rilascio di GnRH (Burcelin R et al., 2003). In accordo con questa osservazione, i pazienti con diabete di tipo 2 hanno mostrato una maggiore prevalenza di ipogonadismo ipogonadotropo e in un modello murino di deplezione centrale del recettore insulinico, il fenotipo somiglia molto a quello evidenziato nella

SM e nell' ipogonadismo ipogonadotropo (Dhindsa S, et al., 2004; Corona G et al., 2006c; Brüning JC et al., 2000). Una recente meta-analisi degli studi trasversali disponibili sulla associazione tra SM e ipogonadismo ha dimostrato che i pazienti con SM presentano livelli plasmatici di T significativamente più bassi (circa 3 nmol/l), in confronto con soggetti di pari età (Corona G et al., 2011a). In particolare, la carenza di androgeni negli uomini è associata con la resistenza all'insulina e l'obesità e il trattamento con T dei pazienti affetti da ipogonadismo migliora la sensibilità all'insulina e riduce la massa grassa (Corona G et al., 2011a). Nonostante queste evidenze, il legame patogenetico e il significato clinico dell'ipogonadismo maschile associato all SM non sono stati completamente chiariti (Corona G et al., 2011b).

Sindrome metabolica e obesità centrale

L'obesità, in particolare l'obesità centrale, è un elemento chiave della SM. Per di più i criteri dell'International Diabetes Federation (IDF) per SM considerano l'obesità centrale come un elemento essenziale per la definizione della sindrome. Recentemente, è stato dimostrato che, sebbene i criteri IDF identificassero un maggiore numero di soggetti con SM rispetto a quello ottenuto con la classificazione NCEP-ATPIII (Corona G et al., 2007b), la definizione di NCEP-ATPIII risulta essere un miglior predittore per la presenza di bassi livelli di T. Infatti, i soggetti che soddisfano i criteri IDF, ma non quelli NCEP-ATPIII, non sembrano avere una maggiore probabilità di sviluppare ipogonadismo rispetto ai soggetti senza SM. I criteri NCEP-ATPIII sono stati considerati, rispetto ai criteri IDF, migliori predittori di altre complicanze della SM, quali DE arteriogenica (Corona G et al., 2007b), diabete (Mannucci E et al., 2008), e patologia cardiovascolare (PCV) (Alexander CM et al., 2003; Monami M et al., 2007). C'è un'importante differenza tra le due definizioni di SM che possono spiegare la debole associazione dei criteri IDF con l'ipogonadismo. Innanzitutto, l'abbassamento del valore soglia per la circonferenza vita e per l'iperglicemia portano ad inserire pazienti con un livello di resistenza all'insulina relativamente basso nella categoria di SM. I livelli bassi di T sono noti per essere associati con l'obesità (Stellato RK et al.,

2000; Oh JY et al., 2002; Laaksonen DE et al., 2003; Pitteloud N et al., 2005; Wu FC et al., 2008; Laaksonen DE et al., 2005). Inoltre, i criteri IDF tendono a sovrastimare il ruolo dell'obesità addominale, la quale è definita come una condizione necessaria per la diagnosi di SM. Sebbene, pazienti obesi siano, in media, caratterizzati da livelli di insulino-resistenza maggiori dei soggetti magri, l'obesità non è sempre associata a insulino-resistenza (Ferrannini E et al., 1997), la quale è il maggiore fattore patogenetico per l'incidenza di diabete di tipo 2 e PCV. Infatti, l'utilizzo di valori soglia più bassi per la circonferenza vita non altera il valore predittivo dei criteri di NCEP-ATPIII per il rischio di PCV, il quale è notevolmente ridotto quando l'adiposità addominale (indipendentemente dalla soglia) è assunta come una condizione necessaria per la diagnosi di SM (Monami M et al., 2007). L'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia, associate ad un eccesso di massa grassa, sono in grado di indurre alterazioni della regolazione della funzione sessuale maschile, attraverso una riduzione dei livelli di T libero totale. Dall'altro lato, l'obesità di per sé, indipendentemente dai disordini metabolici connessi, è notoriamente associata ad una riduzione dei livelli di SHBG (Pitteloud N et al., 2005a; Pitteloud N et al., 2005b). Inoltre, sia Zumoff e collaboratori (Zumoff B et al., 1990) che il nostro gruppo di ricerca (Corona G et al., 2008c) hanno dimostrato che i livelli di T legato e non a SHBG diminuiscono nei maschi obesi in proporzione al loro grado di obesità, anche dopo correzione per le condizioni ad essa connessa. Inoltre, dati ottenuti da soggetti con una obesità morbigena indicano che i livelli e l'ampiezza della pulsatilità del LH erano ridotti se confrontati con soggetti di controllo normopeso (Vermeulen A et al., 1993; Giagulli VA et al., 1994). Queste osservazioni supportano il concetto di un ipoandrogenismo associato con l'obesità. Zitzmann e collaboratori in uno studio trasversale coinvolgente 106 pazienti maschi sani, hanno dimostrato che un basso numero di residui poliglutaminici polimorfici (numero di triplette CAG ripetute) nel gene per il recettore androgenico, suggestivo per una ipersensibilità al T, era associato indipendentemente a minori livelli di massa grassa e a più bassi livelli di insulina plasmatica, oltre che a basse concentrazioni di colesterolo HDL (Zitzmann M et al., 2003). Tuttavia, in una grossa coorte di soggetti residenti in comunità, seguiti per oltre 15 anni nel

Massachusetts Male Ageing Study, Page e collaboratori hanno trovato che il numero di triplette CAG, non predicevano variazioni nelle frazioni lipidiche e non erano correlate all'indice di massa corporea o alla circonferenza vita (Page ST et al., 2006). Quindi, altri studi sono necessari per stabilire se il polimorfismo di AR può regolare l'assetto e il metabolismo lipidico.

Ipogonadismo e obesità centrale: quale è la causa e qual è l'effetto?

L'ipogonadismo può essere considerato una delle molte conseguenze del sovrappeso e dell'obesità. Dall'altro lato, livelli bassi di T possono contribuire all'accumulo di grasso in eccesso, stabilendo così un circolo vizioso. Dati derivati dal MMAS hanno dimostrato un maggior declino dei livelli di T totale e libero in uomini obesi durante gli 8-9 anni di follow-up (Pitteloud N et al., 2005). D'altra parte, modificazioni dello stile di vita al fine di ottenere una perdita di peso corporeo, si associano ad un miglioramento del profilo cardiovascolare, della funzione sessuale ed ad un incremento dei livelli di T circolante (Esposito K et al., 2008; Kaukua J et al., 2003; Niskanen L, et al., 2004). Nonostante i dati, la molecola, che gioca il ruolo principale in questo circolo vizioso rimane sconosciuta. I candidati più accreditati sono: estrogeni, leptina, insulina, TNF α o altre adipochine. In uno studio recente, è stato dimostrato che una bassa dose settimanale (2,5 mg) di letrozolo (un inibitore della aromatasi) può ripristinare i livelli di T e aumentare i livelli di LH in soggetti ipogonadici con obesità severa (Loves S et al., 2008). Pertanto, l'aumentata aromatizzazione degli androgeni da parte del tessuto adiposo aumenta i livelli sierici degli estrogeni, i quali, a loro volta, riducono la secrezione di LH. L'insulina stessa è in grado di stimolare la produzione di T e, contemporaneamente o conseguentemente, di inibire la concentrazione di SHBG (Pasquali R et al., 1995). Quindi l'insulino-resistenza associata con l'obesità potrebbe contribuire ai bassi livelli di T osservati nei soggetti obesi. In accordo a questa osservazione, Pitteloud e collaboratori hanno dimostrato che i livelli di T stimolati da hCG sono positivamente correlati al grado di sensibilità all'insulina (Pitteloud N et al., 2005; Pitteloud N, et al., 2008). La leptina, uno dei principali ormoni prodotti dal tessuto adiposo, induce un

equilibrio energetico negativo, riducendo l'appetito ed aumentando il dispendio energetico (Isidori AM et al., 1999; Isidori AM et al., 2000). La leptina circola nel plasma a concentrazioni proporzionali alla quantità delle riserve di grasso. I recettori per la leptina sono espressi nel tessuto testicolare e un eccesso dei livelli di leptina circolante potrebbe contribuire alla riduzione dei livelli di androgeni osservate nei soggetti obesi (Isidori AM et al., 1999; Isidori AM et al., 2000). D'accordo con tale osservazione, Laughlin e collaboratori hanno dimostrato che un alto rapporto testosterone/estradiolo è associato a livelli più alti di adiponectina e a più bassi livelli di leptina (Laughlin GA et al., 2006). L'obesità è caratterizzata da un aumento dei livelli circolanti di TNF α , conseguenza dell'attivazione della cascata infiammatoria. Morales e collaboratori hanno dimostrato che la liberazione di TNF α a livello intratesticolare è associata ad una risposta al T dopo stimolazione con hCG di minore intensità, suggerendo un possibile contributo di questa molecola nell'ipogonadismo associato ad obesità (Morales V et al., 2003).

Una meta-analisi ha mostrato che la terapia sostitutiva con T in soggetti ipogonadici determina una riduzione nella massa grassa e un miglioramento sia del profilo lipidico che della DE (Isidori AM et al., 2005a; Isidori AM et al., 2005b). Nel maschio, il T inibisce significativamente l'assorbimento di acido oleico nel tessuto adiposo omentale e retro peritoneale, ma non in quello sottocutaneo (Marin P et al., 1996). Inoltre, in uno studio recente sull'invecchiamento maschile, è stato dimostrato che la terapia con T per un anno, in confronto al placebo, riduce selettivamente l'accumulo di grasso viscerale senza modificazioni della massa corporea globale, associata ad un contemporaneo aumento della massa magra e della massa muscolare scheletrica (Allan CA et al., 2008). Complessivamente, questi studi dimostrano che il milieu androgenico influenza la disposizione del grasso viscerale e che questo effetto è rapido e durevole. Dati ottenuti da modelli animali rinforzano il concetto che l'ipogonadismo possa indurre un accumulo di grasso. Topi knock out per il recettore androgenico (ARKO) di sesso maschile, ma non quelli di sesso femminile, sviluppano obesità ad esordio tardivo, con incremento di grasso viscerale e sottocutaneo (Yanase T et al., 2008). Sebbene

i topi ARKO fossero meno dinamici e mostrassero un minor consumo di ossigeno, il principale difetto osservato era una drammatica diminuzione dell'espressione della proteina disaccoppiante di tipo 1 (UCP-1), proteina chiave nella ossidazione lipidica (Yanase T et al., 2008). Questa diminuzione è stata notata sia nel tessuto adiposo bianco (dove AR è maggiormente espresso), sia nel tessuto adiposo bruno (Yanase T et al., 2008). Sono stati inoltre trovati aumentati livelli dei trigliceridi e iperleptinemia (Yu IC et al., 2008). È interessante notare che, risultati simili sono stati anche riportati da Wisniewski e collaboratori nell'uomo: nei soggetti con sindrome da completa insensibilità agli androgeni, dovuta alla mutazione del gene AR, l'obesità è la principale condizione medica evidenziata, che colpisce circa metà dei soggetti (Wisniewski AB et al., 2000). Ulteriori studi in topi "knock out per AR" specifico del tessuto adiposo hanno aggiunto nuove informazioni. Questo modello sviluppa iperleptinemia non associata a leptino-resistenza, fenotipo magro e riduzione dei livelli di trigliceridi e colesterolo (Burcelin R et al., 2003). Questo suggerisce che la deficienza di AR in altri tessuti, come il cervello, fegato e muscolo, può associarsi ad una compromissione del segnale della leptina, con conseguente riduzione degli effetti benefici derivanti dall'aumentata produzione di leptina attraverso la perdita di AR nel tessuto adiposo. Risultati simili sono stati anche ottenuti per l'adiponectina. Xu e collaboratori in precedenza hanno dimostrato che il T riduce i livelli sierici di adiponectina ad alto peso molecolare mediante l'inibizione della sua secrezione dal tessuto adiposo. Questi studi dimostrano che la delezione del gene AR nei topi determina caratteristiche molto simili a quelli che si osservano nei soggetti con SM (Xu A et al., 2005). Peraltro, anche i topi con deficienza del recettore X farnesoide (FXR), un membro della superfamiglia dei recettori nucleari, mostrano un fenotipo con caratteristiche simili alla SM umana. Topi FXR -/- mostrano elevati livelli plasmatici ed epatici di trigliceridi e colesterolo, un'aumentata risposta epatica ad una dieta ricca di carboidrati e resistenza periferica all'insulina (Sinal CJ et al., 2000). È interessante notare che l'androsterone, uno dei principali metaboliti di diidrotestosterone (DHT), è uno steroide di cui si ignorava l'attività biologica fino ad alcuni anni fa e che è ora considerato, insieme agli acidi biliari, un ligando naturale per FXR (Wang S et

al., 2006). E' quindi ipotizzabile che il T eserciti i suoi effetti sul metabolismo lipidico e glicidico non solo attraverso AR ma anche attraverso il legame di un suo metabolita con FXR. Infine, un recente studio condotto dal nostro gruppo di ricerca (Morelli et al. 2013a), in un modello animale non-genomico di SM, ottenuto trattando dei conigli maschi con una dieta ricca in lipidi (HFD), ha fornito nuove conoscenze sui processi patogenetici che sottendono l'associazione tra la SM e l'ipogonadismo ipogonadotropo, almeno nei maschi. Il modello animale di SM utilizzato in questo studio riflette essenzialmente le caratteristiche cliniche maggiori del fenotipo umano; è caratterizzato infatti da iperglicemia, dislipidemia, ipertensione, e aumento della massa adiposa viscerale, oltre a essere associato ad una chiara forma di ipogonadismo ipogonadotropo e ad alterazioni vascolari a livello del tessuto penieno. Morelli e collaboratori hanno dimostrato che le alterazioni metaboliche, HFD-indotte, influenzano negativamente la funzione dei neuroni GnRH attraverso un danno infiammatorio a livello ipotalamico (Morelli et al. 2013a).

Ruolo degli androgeni nel regolare l'accumulo di grasso

L'accumulo di tessuto adiposo, in particolare quello viscerale, è considerato un importante fattore patogenetico per l'insorgenza di insulino-resistenza, aterosclerosi, diabete mellito e SM (Després JP et al., 1992; Smith SR et al., 2001), condizioni tutte spesso associate a concomitante presenza di ipogonadismo nell'uomo. Dopo decenni di intenso dibattito, sta emergendo il consenso che gli steroidi sessuali svolgono un ruolo importante nel regolare la localizzazione della massa grassa nei mammiferi. Dati ottenuti da studi epidemiologici hanno dimostrato che i soggetti con deficit di androgeni hanno una maggiore massa grassa rispetto ai controlli eugonadici e che il trattamento con T diminuisce la massa grassa e aumenta la massa magra negli uomini affetti da ipogonadismo e negli uomini anziani con basse concentrazioni di T; questi effetti del T sulla massa grassa sono correlati con la dose di T e con le concentrazioni circolanti (Wilson JD, 1988; Bhasin S et al., 2001; Snyder PJ et al., 2000; Bhasin S et al., 1997; Snyder PJ et al., 1999). La carenza di androgeni o del recettore androgenico (AR) indotta sperimentalmente è

associata a un aumento della massa grassa e a una diminuzione della massa magra (Mauras N et al., 1998; Matsumoto T et al., 2003). Garcia e collaboratori hanno dimostrato che, nei roditori, elevati livelli di androgeni modulano la proliferazione e la differenziazione dei preadipociti in maniera diversa in specifici depositi di grasso (Garcia E et al., 1999). Il trattamento *in vitro* con T e DHT dei preadipociti epididimali inibisce l'attività della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) un enzima adiposo-specifico (Dieudonne MN et al., 2000). Il T sopprime anche l'attività della LPL e l'uptake dei lipidi negli adipociti (Ramirez ME et al., 1997). Inoltre, è stato osservato che in ratti con elevati livelli di androgeni il differenziamento dei preadipociti in cellule di grasso è compromesso attraverso la modulazione dei fattori trascrizionali C/EBP (Garcia E et al., 1999). Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali il T diminuisce la massa grassa sono ancora poco conosciuti (Brodsky IG, et al., 1996; Mårin P et al. 1992a; Mårin P et al., 1992b). Gli androgeni si legano ad AR, che media la maggior parte delle sue funzioni fisiologiche attivando la trascrizione dei geni a valle (Dieudonne MN et al., 1998; Jaubert AM et al., 1995; Mooradian AD et al., 1995). AR è espresso nei preadipociti e negli adipociti di uomo e di ratto ed è coinvolto nella regolazione della proliferazione e della differenziazione dei preadipociti o delle cellule pluripotenti (Matsumoto T et al., 2003; Dieudonne MN et al., 1998; Jaubert AM et al., 1995; Singh R et al., 2003). Inoltre, è stato suggerito che gli androgeni hanno effetti antiadipogenici nei precursori delle cellule adipose in specifiche regioni dove l'espressione di AR è elevata (Dieudonne MN et al., 1998; Jaubert AM et al., 1995). Topi adulti di sesso maschile knockout per AR presentano un fenotipo pseudo-femminile, e hanno maggiori quantità di grasso corporeo rispetto ai topi maschi wild-type (Matsumoto T et al., 2003; Yeh S et al., 2002). Questi topi knockout per AR (ARKO) sono resistenti al testosterone e diventano obesi per aumento del tessuti adiposo bianco sottocutaneo e intraperitoneale (Matsumoto T et al., 2003). Altri studi sui modelli ARKO hanno confermato che AR svolge un ruolo importante nel metabolismo maschile, influenzando il bilancio energetico e la lipolisi (Sato T, et al., 2003; Fan W et al., 2005). Un effetto negativo dell'attivazione di AR sull'adiposità viscerale è stato chiaramente dimostrato nei topi ARKO (Yanase T et al.,

2008). In accordo, Singh e collaboratori (Singh R et al., 2006) hanno dimostrato che il trattamento *in vitro* con T e DHT inibisce la differenziazione adipogenica della linea cellulare 3T3-L1 attraverso la traslocazione nucleare, AR-mediata, della β -catenina e la conseguente attivazione del signalling di Wnt, che come descritto in precedenza, media effetti anti-adipogenici. Lo sviluppo e la distribuzione del tessuto adiposo bianco nelle diverse regioni anatomiche è un processo complesso, che coinvolge non solo variazioni funzionali relative alla capacità degli adipociti di immagazzinare grassi, ma anche variazioni nel numero degli adipociti stessi dipendente dalla capacità proliferativa e differenziativa di precursori adipogenici (Ginsberg-Fellner F, 1981; Gurr MI et al., 1982; Auwerx J et al., 1996; Gregoire FM, 2001; Rangwala SM, Lazar MA, 2000; Sjöström L et al., 1972). Recenti studi hanno evidenziato come in aggiunta ai preadipociti residenti, la proliferazione e la differenziazione di cellule staminali mesenchimali contribuisca all'accumulo di grasso nel tessuto adiposo e non adiposo (Cartwright MJ et al., 2007; Auwerx J et al., 1996). Il lavoro di Gupta e collaboratori (Gupta V et al., 2008) ha indagato tutti questi aspetti studiando gli effetti degli androgeni, ed in particolare del DHT, per escludere gli effetti indiretti dell'aromatizzazione a estrogeni, non solo sulla differenziazione ma anche sulla proliferazione e sulla funzione di cellule staminali mesenchimali umane (hMSC), ottenute da donatori di sesso maschile, e di preadipociti isolati da tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale di soggetti obesi. Il fatto di aver usato colture cellulari umane rende questo lavoro rilevante per la fisiologia umana rispetto a tutti gli altri studi precedentemente effettuati in modelli murini, pur con tutti i limiti degli studi *in vitro*. Da questo studio è emerso che il DHT inibisce in maniera dose-dipendente la differenziazione sia delle hMSC che dei preadipociti in adipociti maturi. In presenza di DHT gli adipociti differenziati sono più piccoli e accumulano meno lipidi, suggerendo un minor grado di maturazione. Il DHT inibisce, infatti, l'espressione dei marker di differenziazione adipogenica e l'incorporazione degli acidi grassi in trigliceridi. Inoltre, è stato anche visto un effetto stimolatorio del DHT sulla lipolisi, indicando che gli effetti sulla massa grassa sono il risultato netto tra inibizione dell'adipogenesi, riduzione dell'accumulo lipidico e stimolazione della lipolisi. Non è stato invece

evidenziato nessun effetto del DHT sulla proliferazione né delle hMSC che dei preadipociti. Infine, Gupta e collaboratori hanno dimostrato che gli effetti inibitori del DHT sulla differenziazione adipogenica delle hMSC sono mediati dal recettore androgenico, visto che venivano bloccati dalla co-incubazione con bicolutamide, un antagonista selettivo di tale recettore (Gupta V et al., 2008).

Ruolo di FXR nel regolare l'insulino-sensibilità e l'adiposità

Il recettore X farnesoide (FXR, noto anche come NR1H4) è un recettore nucleare, espresso nel fegato, nell'intestino, nel rene, nelle ghiandole surrenali e nel tessuto adiposo (Zhang Y et al., 2003; Bishop-Bailey D et al., 2004; Rizzo G et al., 2006), i cui ligandi naturali sono gli acidi biliari (AB), recentemente identificati come importanti modulatori dell'omeostasi metabolica e dell'insulino-resistenza (Thomas C et al., 2008). In seguito alla sua attivazione, FXR regola l'espressione dei geni target legandosi agli elementi responsivi di FXR, dopo aver formato un eterodimero con il recettore dell'acido retinoico (RXR) (Forman B et al., 1995). Uno dei più importanti ruoli fisiologici svolto da FXR è quello di proteggere gli epatociti dagli effetti deleteri del sovraccarico di AB, diminuendone la produzione endogena attraverso la riduzione dell'espressione della colesterolo-7-idrossilasi (Cyp7a1), l'enzima limitante (rate-limiting) nella via biosintetica, e accelerandone la biotrasformazione ed escrezione, attraverso l'induzione della proteina legante AB a livello intestinale (Grober J et al., 1999), l'inibizione del trasportatore di AB (polipeptide co-trasportatore del sodio taurocolato, NTCP) a livello epatico (Denson LA et al., 2001) e l'induzione della pompa di esportazione dei sali biliari (BSEP) (Ananthanarayanan M et al., 2001; Kuipers F, et al., 2004). Inoltre, studi in topi "knockout" per FXR (FXR^{-/-}) hanno dimostrato il ruolo fondamentale di FXR nel regolare il metabolismo lipidico, dal momento che questi topi mostrano elevati livelli sierici di trigliceridi e di colesterolo-HDL (Sinal CJ et al., 2000). Recentemente, diversi studi hanno suggerito che FXR potrebbe anche regolare il metabolismo epatico dei carboidrati (Cariou B et al., 2005a). La prima prova a favore di questa ipotesi è stata la ridotta espressione epatica di FXR in modelli sperimentali di diabete (De Fabiani E et al., 2003).

L'espressione epatica di FXR nei topi varia anche a seconda dei cambiamenti nutrizionali: aumenta durante il digiuno e diminuisce in seguito all'assunzione di cibo (Zhang Y et al., 2004; Duran-Sandoval D et al., 2005). Inoltre, l'attivazione di FXR da parte di AB o da parte di GW4064, l'agonista sintetico specifico non steroideo (Maloney PR et al., 2000), modula l'espressione dell'enzima gluconeogenico fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) (Cariou B et al., 2005a). Tuttavia, dati contrastanti riportano sia effetti positivi (Stayrook KR et al., 2005) che negativi (De Fabiani E et al., 2003; Yamagata K et al., 2004) di AB e/o GW4064 sull'espressione genica di PEPCK. Uno studio del 2005, su topi FXR^{-/-}, ha evidenziato anche un ruolo di FXR nel regolare la cinetica del metabolismo epatico dei carboidrati durante la fase di transizione digiuno-alimentazione. Sembra, infatti, che FXR sia in grado di modulare sia la via glicolitica che quella lipogenica interferendo direttamente con la trascrizione dei geni glucosio-regolati, come la piruvato chinasi epatica (Duran-Sandoval D et al., 2005). Inoltre, FXR controlla anche la reazione di adattamento al digiuno, dal momento che topi FXR^{-/-} mostrano una ipoglicemia transitoria durante il digiuno (Cariou B et al., 2005b). Tre studi indipendenti suggeriscono un ruolo di FXR nella regolazione della sensibilità insulinica (Cariou B et al., 2006; Ma K et al., 2006; Zhang Y et al., 2006). Il deficit di FXR porta ad una alterata tolleranza al glucosio e a insulino-resistenza. La tecnica del clamp iperinsulinemico-euglicemico ha confermato che topi FXR^{-/-} mostrano un'insulino-resistenza periferica osservabile dal ridotto smaltimento periferico di glucosio (Cariou B et al., 2006; Ma K et al., 2006). Coerentemente con queste osservazioni, il signalling dell'insulina è alterato nei tessuti periferici insulino-sensibili, come il muscolo scheletrico e il tessuto adiposo bianco (Cariou B et al., 2006; Ma K et al., 2006). Tuttavia, in letteratura sono riportati dati discordanti per quanto riguarda il livello di sensibilità insulinica epatica nei topi FXR^{-/-}. Alcuni studi hanno trovato, nei topi FXR^{-/-}, una ridotta inibizione della produzione epatica di glucosio durante il clamp a basso dosaggio di insulina (Ma K et al., 2006) e una compromissione del signalling dell'insulina a livello epatico (Ma K et al., 2006; Zhang Y et al., 2006). Al contrario, in altri lavori, il deficit di FXR è stato dimostrato essere associato a una normale sensibilità e a un corretto signalling

dell'insulina a livello epatico (Cariou B et al., 2006; Duran-Sandoval D et al., 2005). La ragione di questa discrepanza non è chiara, ma può essere collegata a background genetici diversi [C57Bl6 / J (Ma K et al., 2006; Zhang Y et al., 2006) vs C75Bl6 / N (Cariou B et al., 2006; Duran-Sandoval D et al., 2005)] del topo e/o alla dose di insulina utilizzata durante il clamp. Sulla base di questi risultati, la previsione è che l'attivazione di FXR promuove la sensibilità all'insulina. In accordo con questa ipotesi, il trattamento con GW4064 migliora la sensibilità insulinica sia nei topi db/db, KK-A(y) (Zhang Y et al., 2006), che in quelli ob/ob (Cariou B et al., 2006). Risultati simili sono stati ottenuti in seguito alla overespressione adenovirus-mediata di FXR costitutivamente attivo nel fegato di topi db/db (Zhang Y et al., 2006). I meccanismi molecolari alla base dell'effetto insulino-sensibilizzante di FXR restano ancora non chiari. Poiché FXR non è espresso nel muscolo scheletrico, è plausibile che il deficit di FXR alteri indirettamente il signalling dell'insulina in questo tessuto. Una ipotesi è che il deficit di FXR promuova la deposizione ectopica di lipidi nei tessuti bersaglio dell'insulina, un fenomeno solitamente denominato "lipotossicità" (Savage DB et al., 2007). Infatti, topi FXR^{-/-} mostrano elevati livelli di acidi grassi liberi circolanti (Cariou B et al., 2006; Ma K et al., 2006) e un aumento di trigliceridi intramuscolari (Ma K et al., 2006). Inoltre, il livello di fosforilazione della serina-307 del substrato del recettore dell'insulina-1 (IRS-1), che è legata all'insulino-resistenza indotta dagli acidi grassi (Yu C et al., 2002), è aumentata nel muscolo scheletrico di topi FXR^{-/-} (Ma K et al., 2006). Un meccanismo simile potrebbe funzionare anche nel fegato, dal momento che il contenuto dei trigliceridi epatici è aumentata nei topi FXR^{-/-} (Cariou B et al., 2006; Ma K et al., 2006). Al contrario, il trattamento con GW4064 riduce l'accumulo di lipidi neutri nel fegato di topi db/db (Zhang Y et al., 2006). Dati recenti suggeriscono che FXR svolge un ruolo anche nella differenziazione e nella funzione degli adipociti. Rizzo e collaboratori hanno infatti dimostrato che l'attivazione di FXR da parte dei ligandi naturali o sintetici regola la differenziazione dei preadipociti di topo 3T3-L1 in adipociti maturi (Rizzo G et al., 2006). L'analisi dell'espressione genica di FXR durante l'adipogenesi in questa linea cellulare dimostra che l'mRNA di FXR aumenta rapidamente in risposta a induzione adipocitaria con DIM (un cocktail

ormonale a base di insulina, desametazone e IBMX), mentre non era rilevabile negli adipociti indifferenziati. L'attivazione di FXR con il ligante sintetico selettivo di FXR, 6 α -ECDCA/INT-747 (OCA; Rizzo G et al., 2010; Wang YD et al., 2008; Wang XX et al., 2009; Wang XX et al., 2010), determina una rapida acquisizione da parte delle cellule 3T3-L1 del fenotipo adipocitario con gocce lipidiche nel citoplasma di dimensioni maggiori rispetto a quanto osservato nel caso delle cellule trattate solo con DIM. Inoltre, l'esposizione delle cellule 3T3-L1 a ligandi naturali o sintetici di FXR incrementava l'espressione di un certo numero di geni adipocita-specifici, DIM-regolati, come C/EBP α , PPAR γ 2 e FABP4, mentre riduceva l'espressione di TNF- α , un mediatore chiave della lipolisi. Rizzo e collaboratori hanno inoltre condotto esperimenti *in vivo* sia su topi wild-type che su topi FXR $-/-$ e hanno dimostrato che l'attivazione di FXR con OCA aumenta nel tessuto adiposo l'espressione di C/EBP α , PPAR γ 2 e FABP4, mentre inibisce l'espressione di TNF- α nei topi wild-type, suggerendo che FXR è coinvolto nella regolazione sia dell'adipogenesi, inducendo i geni C/EBP α , PPAR γ 2, che nell'accumulo di lipidi, inducendo FABP4 e inibendo TNF- α . Dato che questi effetti non sono stati osservati nei topi FXR $-/-$, è stato ipotizzato che la somministrazione di OCA richieda un gene FXR intatto al fine di poter suscitare le sue attività metaboliche (Rizzo G et al., 2006). Questi dati, complessivamente, confermano quanto precedentemente dimostrato da Cariou e collaboratori in uno studio effettuato nei topi FXR $-/-$ (Cariou B et al., 2006). Infatti, i fibroblasti embrionali murini isolati da topi FXR $-/-$ non erano in grado di accumulare correttamente i trigliceridi durante la differenziazione in adipociti. Coerentemente con questi dati *in vitro*, i topi FXR $-/-$ mostravano un fenotipo lipoatrofico moderato probabilmente responsabile della ridotta sensibilità insulinica osservata in questi topi (Kapoor D et al., 2005). Effettivamente, il trattamento con l'agonista dell'FXR, GW4064, migliorava il signalling dell'insulina e l'uptake del glucosio insulina-indotto negli adipociti 3T3-L1 differenziati (Cariou B et al., 2006, Rizzo G et al., 2006). Tutta una serie di studi preclinici ha, inoltre, dimostrato che OCA esercita effetti antinfiammatori e antifibrotici nel fegato, nei reni e nell'intestino, i principali organi che esprimono FXR.(Adorini L et al., 2012). Alla luce della crescente evidenza

preclinica del potenziale terapeutico degli agonisti di FXR nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, OCA è stato testato in un studio di fase 2 in pazienti con diabete di tipo 2 e con steatosi epatica non alcolica (NAFLD), determinando un miglioramento della sensibilità all'insulina e una riduzione dei marcatori di infiammazione e di fibrosi a livello epatico (Adorini L et al., 2012; Mudaliar S et al., 2013). Inoltre, dati ottenuti dal recente studio FLINT (The Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment), uno studio clinico multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato con placebo, effettuato su pazienti con steatoepatite non alcolica, non cirrotica, hanno dimostrato che il trattamento con OCA migliora le caratteristiche istologiche della steatoepatite non alcolica, tra cui la steatosi epatica, l'infiammazione e la fibrosi (Neuschwander-Tetri BA et al., 2014). Nonostante il miglioramento delle caratteristiche chiave della steatoepatite non alcolica, tra cui la fibrosi, questi miglioramenti non sono stati sufficienti a ridurre il numero di pazienti con diagnosi di steatoepatite non-alcolica. I risultati positivi sono attenuati dalla presenza di prurito nel 23% dei pazienti, da un aumento del colesterolo totale e LDL, e da una modesta diminuzione del colesterolo HDL. Studi a lungo termine sono necessari per confermare gli effetti benefici di OCA nei pazienti con steatoepatite non-alcolica, e per determinare la rilevanza clinica delle variazioni dei lipidi circolanti indotte dal ligando di FXR. (Neuschwander-Tetri BA et al., 2014).

Scopo della tesi

La sindrome metabolica (SM), e in particolare l'obesità viscerale, è spesso associata nel maschio alla presenza di ipogonadismo, ovvero ad una riduzione dei livelli plasmatici di T (Corona G et al., 2006a; Laaksonen DE et al., 2003; Kapoor D et al., 2005; Corona G et al., 2011a). Numerosi studi epidemiologici indicano che la SM potrebbe predire lo sviluppo dell'ipogonadismo maschile (Laaksonen DE et al., 2005; Derby CA et al., 2006; Rodriguez A et al., 2007), così come l'ipogonadismo di per sé rappresenta un fattore di rischio per la SM e le complicanze associate, come il diabete mellito di tipo 2 (Stellato RK et al., 2000; Oh JY et al., 2002; Kupelian V et al., 2006) e le patologie cardiovascolari (Rosano GM et al., 2007; Maggi M et al., 2007). Non è stato, tuttavia, ancora chiarito quale sia la reale relazione causa-effetto tra queste morbidità che sembrano instaurare un vero e proprio circolo vizioso.

Il presente lavoro è stato, pertanto, intrapreso al fine di studiare i complessi meccanismi patogenetici che sottendono l'associazione tra ipogonadismo e SM utilizzando un modello animale di SM, già sviluppato nel nostro laboratorio in seguito al trattamento, per 12 settimane, di conigli maschi adulti con una dieta ricca in lipidi (HFD, high fat diet) (Filippi S et al. 2009; Vignozzi L et al., 2011, Vignozzi L et al., 2012, Morelli A et al., 2011; Morelli A et al., 2012; Morelli A et al., 2013a; Morelli A et al., 2013b; Comeglio P et al., 2014). Un sottogruppo di questi conigli HFD è stato sottoposto a terapia suppletiva con T. Un altro sottogruppo di conigli HFD è stato invece trattato cronicamente con OCA, un agonista sintetico del recettore FXR implicato non solo nel controllo dell'omeostasi lipidica e glucidica, ma anche nella regolazione della funzione del tessuto adiposo (Rizzo G et al., 2006; Cariou B et al., 2006). In tal modo è stato possibile confrontare i fenotipi dei vari gruppi sperimentali e indagare se il trattamento terapeutico con T o con OCA potesse migliorare le alterazioni metaboliche, incluso lo sviluppo di obesità viscerale.

La disfunzione del tessuto adiposo rappresenta il principale fattore patogenetico delle complicanze metaboliche e cardiovascolari legate alla SM e all'obesità ed il ruolo del T nel regolare tale funzione è ancora piuttosto

controverso. Lo scopo principale dello studio è stato quindi quello di valutare la presenza di eventuali differenze nella capacità differenziativa dei precursori cellulari del tessuto adiposo viscerale tra i vari gruppi sperimentali, isolando e caratterizzando i preadipociti (rPAD, rabbit preadipocytes) e sottoponendoli a induzione adipogenica. In tal modo è stato possibile valutare gli effetti del trattamento *in vivo* con fattori coinvolti nel processo adipogenico, come T e OCA, sulle modificazioni del tessuto adiposo viscerale indotte dalla SM.

Materiali e metodi

Trattamento degli Animali

Per gli esperimenti sono stati utilizzati conigli maschi adulti di razza New Zealand (Charles River, Calco, Lecco, Italia) che pesavano circa 3 kg. Ogni animale è stato tenuto in gabbie singole in condizioni standard in una stanza a temperatura e umidità controllate e con ciclo alternato di 12 ore di luce/buio. Per tutta la durata dello studio sia il cibo che l'acqua erano disponibili senza limitazioni. Gli animali, dopo una settimana di dieta standard per conigli, sono stati suddivisi in maniera random nel gruppo dei controlli e in quello dei trattati. Il gruppo di controllo, continuava a ricevere una dieta standard (controllo; n=35/38), mentre il gruppo dei trattati veniva nutrito per 12 settimane con una dieta ricca in lipidi (HFD; n=32/36) costituita da 0,5 % di colesterolo e 4 % di olio d'arachidi (conigli HFD) modificata da protocolli già pubblicati (Azadzoï KM et al., 1991; Najibi S et al., 1994). La dieta speciale per conigli è stata acquistata dalla ditta Mucedola (Settimo Milanese, Milano, Italia). Ad un primo sottogruppo di conigli HFD è stata somministrata per 12 settimane una dose farmacologica di testosterone (T; 30 mg/Kg, una volta a settimana; n=19) usando una miscela di 110 mg di T enantato (estere del testosterone naturale) e di 25 mg di T propionato, che corrispondono a 100 mg di T (Bayer Schering Pharma, Berlino, Germania), come descritto in un precedente protocollo (Vignozzi L et al., 2009; Fibbi B et al., 2009; Filippi S et al., 2009). Un secondo sottogruppo di conigli HFD è stato invece trattato cronicamente con OCA (10 mg/kg al giorno per 5 giorni alla settimana, mediante sonda gastrica orale; Intercept Pharmaceuticals Inc., New York, USA; n=18) per 12 settimane, come descritto precedentemente (Vignozzi L et al., 2011; Morelli A et al., 2012). Un terzo sottogruppo di conigli HFD è stato trattato con l'agonista selettivo di TGR5, INT-777 (30 mg/kg, daily 5 days a week for 12 weeks, by oral gavage; n=6; Pellicciari R et al., 2009). I valori di glicemia, colesterolo totale, trigliceridi, aspartato-aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT), T e 17 β -estradiolo (E₂) sono stati ottenuti, prelevando dalla vena marginale dell'orecchio dei conigli, campioni ematici al tempo zero (inizio) e alla 12^o settimana (fine trattamento). Il sangue è stato

immediatamente centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti, e il plasma raccolto è stato riposto a -20° C fino al momento dell'analisi. La pressione arteriosa media (MAP) è stata misurata alla 12^o settimana, dopo sedazione con pentobarbital (45 mg/Kg), incannulando l'arteria femorale con un catetere di polietilene. Successivamente gli animali sono stati sacrificati tramite una dose letale di pentobarbital. Dopo il sacrificio campioni di vescichette seminali, testicoli, fegato e tessuto adiposo viscerale sono stati raccolti e adeguatamente conservati per le successive analisi. I campioni di VAT di ciascun gruppo sperimentale sono stati inoltre processati per l'isolamento dei preadipociti. Sulla base di un'analisi ad interim, a causa della mancanza di un effetto di INT-777 sull'iperglicemia e sui parametri complessivi della sindrome metabolica (iperglicemia, alti livelli di trigliceridi, alti livelli di colesterolo, aumento della pressione arteriosa e accumulo di grasso viscerale) e ad una inaspettata ipertrofia della cistifellea, gli esperimenti con INT-777 sono stati fermati, e, pertanto, i dati disponibili sono limitati a sei conigli.

Misurazione dei parametri biochimici

I livelli plasmatici di colesterolo, trigliceridi, glicemia, AST ed ALT sono stati misurati con un Sistema Automatico (ADVIA 2004, Siemens, Chemistry System; Siemens Science Medical Solution Diagnostic, Tarrytown, NY). I livelli plasmatici di T e E₂, ottenuti tramite un procedimento di estrazione, sono stati valutati attraverso un sistema automatico a chemiluminescenza (Immunolite 2000 Siemens, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield USA). Per l'estrazione i campioni di sangue sono stati mischiati per 15 minuti con 4 volumi di dietil estere, poi centrifugati per 5 minuti a 2000 rpm, e la fase acquosa così ottenuta è stata congelata in ghiaccio secco. La fase organica è stata recuperata, fatta evaporare sotto un flusso di azoto, e ricostituito nella soluzione d'analisi.

Test di tolleranza al glucosio per via orale

Il test di tolleranza al glucosio per via orale (OGTT) è stato effettuato in accordo ai protocolli già pubblicati (Filippi S et al., 2009). Dopo un periodo di circa 12 ore di digiuno, agli animali è stata somministrata per via orale una soluzione al 50% di glucosio ad una dose di 1,5 g/Kg. Prima di somministrare il carico di glucosio e a 15, 30 e 120 minuti da esso sono stati raccolti campioni ematici tramite prelievo dalla vena marginale dell'orecchio. Per ottenere il plasma i campioni, dopo essere stati mantenuti in ghiaccio, sono stati centrifugati a 3000 rpm per 20 min a 4° C. La glicemia è stata misurata come descritto in precedenza. L'area incrementale sotto la curva (iAUC) è stata calcolata usando il software GRAPHARD PRISM versione 4.0 per Windows.

Analisi morfometrica di sezioni di tessuto adiposo viscerale

I campioni di tessuto adiposo viscerale di ciascun gruppo sperimentale sono stati inclusi in paraffina e successivamente utilizzati per ottenere sezioni di circa 3µm di spessore. Le sezioni di tessuto adiposo sono state poi colorate con ematossilina-eosina utilizzando protocolli standard. Il diametro degli adipociti è stato misurato al microscopio Nikon Microphot-FXA (Nikon, Tokyo, Giappone) considerando gli adipociti più regolarmente sferici e utilizzando il programma computerizzato ImageJ.

Rilevamento dell'ipossia e immunoistochimica

Il grado di ossigenazione dei campioni di tessuto adiposo viscerale è stato analizzato mediante uno specifico kit (Hypoxyprobe TM-1, Chemicon International, CA, USA) che utilizza un farmaco bio-reattivo, il pimonidazolo-idroclorito (Hypoxyprobe-1, 60mg/kg), che viene iniettato intraperitonealmente un'ora prima del sacrificio, riconosciuto come marcatore standard della presenza di ipossia. Il pimonidazolo è solubile in acqua e si distribuisce rapidamente in tutti i tessuti del corpo costituendo degli addotti proteici esclusivamente nelle zone ipossiche, che hanno quindi una pressione di ossigeno uguale o inferiore a 10 mmHg. Brevemente, i campioni di tessuto

adiposo viscerale, fissati in formalina 4% subito dopo l'isolamento, vengono deidratati e incorporati in paraffina. Le cellule ipossiche sono facilmente individuate con un anticorpo monoclonale (Hypoxyprobe-1 Mab1), seguendo il protocollo della casa produttrice (Morelli A et al., 2012, Morelli A et al., 2013b, Vignozzi L et al., 2012). La quantificazione dell'ipossia è stata ottenuta usando Adobe Photoshop 6.00 ® software (Adobe Systems).

Analisi Western Blot

I campioni di tessuto adiposo viscerale sono stati processati in azoto liquido e suddivisi in due aliquote: una per l'estrazione delle proteine totali e l'altra per la separazione della frazione di membrana dalla frazione citosolica, effettuata con il sistema ProteoExtract (Calbiochem-Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Gli estratti proteici sono stati quantificati con il metodo BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) e 15 µg di ogni campione sono stati separati tramite SDS-PAGE al 10% e trasferiti su membrana di PVDF (ImmobiloneP, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Le membrane sono state bloccate per 1 ora in TBS (TRIS-buffered saline; 0.1% Tween 20) e skim milk al 5%. Successivamente, le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario (anti-GLUT4 (1:1000), Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA; anti-perilipina 1 (1:1000), anti-pAKT (1:1000), anti-AKT (1:1000), anti-STAT1 (1:1000) and anti-actin (1:1000), Santa Cruz Biotechnology) a 4°C per tutta la notte e poi sono state incubate con il rispettivo anticorpo secondario. L'analisi densitometrica dell'intensità delle bande è stata ottenuta utilizzando il software Photoshop 5.5 (Adobe Systems, Inc. Italia srl).

Istologia del fegato

La steatosi epatica è stata valutata mediante colorazione Oil Red O delle sezioni di fegato. Le sezioni congelate sono state tagliate al criostato e sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 20 minuti a temperatura ambiente (RT). Successivamente le sezioni sono state trattate per 2-5 minuti con isopropanolo e poi sono state colorate con Oil Red O per 20 minuti. La

soluzione Oil Red O è stata preparata diluendo una soluzione madre (0,3 g di Oil Red O in 100 ml di isopropanolo) con acqua (3:2) seguito da filtrazione. Dopo la colorazione Oil Red O, le sezioni sono state lavate più volte in acqua e colorate con ematossilina ed eosina per evidenziare i nuclei degli epatociti. Infine, le sezioni sono state fotografate e la quantificazione computerizzata della Oil Red O-positività è stata fatta dopo la sottrazione dello sfondo utilizzando il software Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems).

Analisi immunostochimica dell'espressione del TNF α

Le sezioni di fegato sono state incubate per una notte a 4°C con un anticorpo primario anti-TNF α (TNF α) (influximab 1:100 vol/vol, DakoCytomation, Copenhagen, Danimarca). Le sezioni sono state lavate in PBS e incubate con un anticorpo secondario biotilato e poi con un complesso streptavidina-biotina-perossidasi (Ultravision large volume detection system anti-polyvalent, Lab Vision, Fremont, CA, USA). Il prodotto di reazione è stato sviluppato con 3',3'-diaminobenzidina tetraidrocloride come cromogeno (Sigma-Aldrich). Esperimenti di controllo sono stati eseguiti omettendo l'anticorpo primario. Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio Nikon Microphot-FXA. La quantificazione computerizzata della colorazione di TNF α è stata fatta dopo la sottrazione dello sfondo utilizzando il software Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems).

Isolamento dei preadipociti dal tessuto adiposo viscerale

L'isolamento dei preadipociti viscerali di coniglio (rPAD, rabbit preadipocytes) è stato effettuato in base a un protocollo precedentemente pubblicato (Zuk PA et al., 2002). In breve, i campioni di tessuto adiposo viscerale, dopo essere stati rimossi in condizioni sterili, sono stati immediatamente messi in Terreno Dulbecco modificato (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) senza siero, supplementato con streptomina e penicillina. Successivamente, i campioni di tessuto adiposo viscerale sono stati lavati in tampone fosfato salino (PBS), processati meccanicamente con forbici e pinze sterili, prestando

attenzione ad eliminare tutto il sangue e la componente fibrosa, e, infine, digeriti enzimaticamente con una soluzione di collagenasi II (Sigma-Aldrich) in un bagnetto termico in agitazione a 37 ° C per 60 minuti. Il pellet è stato raccolto mediante centrifugazione a 2300 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e poi trattato con tampone di lisi dei globuli rossi. Dopo la centrifugazione il supernatante è stato rimosso e il pellet cellulare è stato risospeso in DMEM/F12 supplementato con 10% di Siero Bovino Fetale (FBS) (Sigma-Aldrich), 2 mM di glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/ml di penicillina (Sigma-Aldrich) e 100 µg/ml di streptomicina (pen/strep) (Sigma-Aldrich), filtrato e piastrato in piastre petri con diametro di 100 mm a una diluizione appropriata. Le cellule rPAD sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 95% con il 5% (Sigma-Aldrich) di CO₂. Ogni 24 ore il terreno è stato sostituito con terreno fresco, lavando accuratamente la coltura con PBS. Dopo circa 4-5 giorni, la popolazione cellulare passaggio 0 (P) giunta alla subconfluenza (circa il 90% della superficie della piastra) è stata lavata in PBS e staccata con tripsina 0.25%/EDTA, contata e risospesa in terreno di coltura per ottenere la popolazione secondaria (P₁). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati sulle popolazioni P₁.

Caratterizzazione immunofenotipica mediante citometria a flusso

Le cellule rPAD sono state analizzate per l'espressione di molecole di superficie cellula-specifiche mediante citometria a flusso come precedentemente pubblicato (Mazzanti B et al., 2008). Brevemente, le cellule, una volta staccate dalle piastre mediante trattamento con tripsina 0.25%/EDTA e lavate in HBSS e FBS 10%, sono state risospese in un tampone di citometria a flusso costituito da CellWASH (sodio azide allo 0,1% in PBS; Becton Dickinson) ed FBS al 2%. Le aliquote (1.5x10⁶ cellule/100ml) sono state incubate con i seguenti anticorpi monoclonali coniugati: CD34-PE, CD45-FITC (al fine di quantificare la contaminazione emopoietica); CD14-PE (al fine di quantificare la contaminazione monocitica); CD31-FITC (al fine di quantificare la contaminazione endoteliale); CD90-PE, CD106-FITC (tutti acquistati da BD Pharmingen, San diego, CA, USA) e CD105-PE (Ansell,

Bayport, MN, USA). La fluorescenza non-specifica e i parametri morfologici delle cellule sono stati determinati incubando la stessa aliquota di cellule con anticorpi monoclonali di topo isotype-matched (Becton Dickinson, San diego, CA, USA). Il 7-AAD è stato aggiunto al fine di escludere le cellule morte dall'analisi. L'acquisizione della citometria a flusso è stata effettuata attraverso la raccolta di 10^4 eventi su uno strumento FACScalibur (Becton Dickinson) e i dati sono stati analizzati sul software CELL QUEST (Becton Dickinson).

Protocollo di differenziazione adipogenica

Le cellule rPAD sono state piastrate in presenza del terreno di coltura in piastre da 6 (8×10^4 cellule/pozzetto) o da 96 pozzetti (9×10^3 cellule/pozzetto) e lasciate raggiungere la confluenza. Due giorni dopo la confluenza (tempo 0), le cellule rPAD sono state lasciate non trattate oppure sono state trattate con la miscela di differenziazione adipogenica (isobutilmetilxantina 0,5mM; insulina 5 μ g/ml; desametazone 1 μ M; Sigma-Aldrich) per 8 giorni (Student AK et al., 1980). Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 48 ore, e poi le cellule sono state spostate in un terreno contenente 10 g/ml di insulina per 48 ore.

Valutazione qualitativa e quantitativa dell'accumulo di trigliceridi

Per la valutazione qualitativa dell'accumulo di trigliceridi, le cellule rPAD, al termine dei 10 giorni di induzione adipogenica, sono state fissate in formalina, colorate con Oil Red O (Sigma-Aldrich) e osservate al microscopio per valutare la presenza di goccioline lipidiche nelle cellule trattate con la miscela di differenziazione adipogenica rispetto alle cellule non trattate. Inoltre, il contenuto di trigliceridi è stato quantificato utilizzando l'Adipored Assay (Cambrex BioScience, Walkersville, MD). Brevemente, le cellule rPAD sono state differenziate, come descritto sopra, e, al termine dei 10 giorni di induzione adipogenica, 5 μ l di reagente Adipored sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Dopo 10 minuti, la fluorescenza è stata misurata a una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 572 nm. La capacità di accumulo di trigliceridi è stata espressa come variazione percentuale rispetto

alla fluorescenza rilevata nelle cellule non trattate. Infine, per testare le differenze di sensibilità all'insulina nelle cellule rPAD_{controllo}, rPAD_{HFD} e rPAD_{HFD+T}, l'Adipored Assay è stato effettuato al termine di 10 giorni di induzione adipogenica mantenendo le cellule per 24 ore in DMEM senza siero e poi esponendole a concentrazioni crescenti di insulina (0 nM; 7,5 nM; 50 nM; 100 nM; 500 nM) per 4 ore.

Microscopia a fluorescenza

Le cellule rPAD, Adipored-colorate, sono state fotografate immediatamente utilizzando un microscopio Leica DMI6000 dotato di una fotocamera DFC350FX. Le immagini sono state acquisite con il filtro di serie Leica N3 e con un obiettivo con collare di protezione Fluotar 20X 0.4NA. Le cellule Adipored-positive, identificate come quelle che mostrano chiaramente una colorazione delle goccioline lipidiche, sono state contate. utilizzando il software ImageJ ed espressi come variazione percentuale rispetto alle cellule totali

Microscopia confocale

Le cellule rPAD DIM-trattate, Adipored-colorate, sono state fotografate immediatamente utilizzando un microscopio confocale Leica SP2-AOBS. Le immagini sono state raccolte come z-stacks con un obiettivo a immersione in acqua 1.2NA 63X, secondo il criterio di Nyquist e avendo cura di ridurre al minimo l'aberrazione sferica regolando il collare di correzione dell'obiettivo. Le immagini sono state quindi deconvolute con il software Huygens Professional (SVI, The Netherlands) utilizzando l'algoritmo Classic Maximum Likelihood Estimation (CMLE) e la funzione di diffusione del punto (Point Spread Function, PSF). Infine, le immagini deconvolute sono state quantitativamente analizzate utilizzando il software Velocity 5 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) per misurare il numero e il volume delle gocce lipidiche.

Immunolocalizzazione di GLUT4 e SNAP23

Le rPAD DIM-trattate sono state coltivate per 24 ore in DMEM senza siero e poi incubate per 5 ore con insulina (100 nM). Le cellule sono state poi trattate per 15 min con il marker di membrana WGA (Wheat Germ Agglutinin) coniugato con rodamina (1:250, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e fissate con paraformaldeide al 3,7% (pH 7,4) per 10 minuti. L'immunomarcatura è stata effettuata utilizzando un anticorpo anti-GLUT4 (1:40, Abcam Ltd, Cambridge, UK) o un anticorpo anti-SNAP23 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), seguiti rispettivamente da un anticorpo secondario anti-topo di capra Alexa Fluor 488 (A11001, 1:200; Molecular Probes) o da un anticorpo secondario anti-capra di topo coniugato con FITC (1:50; Sigma-Aldrich). La colocalizzazione GLUT4-WGA o SNAP23-WGA è stata acquisita con il microscopio confocale Leica SP2-AOBS ed è stata analizzata utilizzando il plugin COLOC del software ImageJ. I risultati sono dati dall'algoritmo di sovrapposizione di Person.

Saggio di captazione del glucosio

Le cellule rPAD sono state differenziate, come descritto sopra, e, al termine dei 10 giorni di induzione adipogenica è stato effettuato il saggio di captazione del glucosio marcato secondo un protocollo già pubblicato (Raimondi L et al., 2004). Brevemente, le cellule sono state lasciate per 24 ore in DMEM senza siero e poi esposte a dosi crescenti di insulina (1nM, 5nM, 10nM, 50nM) in soluzione di Krebs' senza glucosio, con l'aggiunta di 2,5 mM Ca^{2+} e 1mg/ml di albumina per 30 minuti. Successivamente è stato aggiunto il 2-deossi- ^3H d-glucosio (10 μM) per 5 minuti al termine dei quali le cellule sono state lavate con PBS e lisate con NaOH 0,5 N. La misurazione del glucosio radioattivo captato è stata effettuata in liquido di scintillazione e utilizzando uno strumento β -counter (Perkin Elmer, CA, USA).

Estrazione dell'RNA e analisi quantitativa RT-PCR (qRT-PCR)

L'estrazione dell'RNA dalle cellule rPAD è stata effettuata usando i reagenti TRIZOL e seguendo le istruzioni del produttore (Invitrogen S.r.l., Carlsbad, CA). Il cDNA è stato ottenuto usando un kit della Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories), come descritto in precedenza (Morelli A et al. 2012; Morelli A et al. 2013b). L'analisi quantitativa dei mRNA di interesse è stata effettuata secondo metodo real-time PCR, usando SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories) per la marcatura fluorescente. La subunità 18S dell'RNA ribosomiale è stata scelta come gene di riferimento per normalizzare e quantificare in maniera relativa i geni di interesse. I primer per l'amplificazione di questi geni sono stati disegnati sulla base delle sequenze specifiche di coniglio pubblicate nella GeneBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e sono stati descritti precedentemente (Filippi S et al., 2009, Morelli A et al., 2012; Morelli A et al., 2013b, Vignozzi L et al., 2012). L'amplificazione e l'analisi dei dati sono state eseguite con il sistema MyiQ™2 Two-Colors Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories) secondo il protocollo seguente: 95°C per 30 s e 60°C per 1 min per un totale di 40 cicli seguiti dall'analisi della curva di dissociazione per verificare la specificità del primer. L'analisi dei risultati è stata basata sul metodo di confronto del ciclo soglia (C_T) seguendo le istruzioni del produttore (Bio-Rad Laboratories), come descritto in precedenza (Morelli A et al., 2012; Morelli A et al., 2013b).

Analisi Statistiche

I risultati sono espressi in medie \pm errore standard della media (SEM) per n esperimenti. Le analisi statistiche sono state effettuate con un test di analisi della varianza, seguito da un'analisi post hoc Tukey-Kramer in modo tale da poter valutare le differenze tra i gruppi ed è stato considerato significativo un $p < 0,05$. Per calcolare il valore di concentrazione al quale la risposta è la metà della risposta massimale (EC_{50}) e per misurare il valore di risposta massimale (E_{max}) è stato usato il programma per computer ALLFIT (De Lean A et al., 1978). Le correlazioni sono state effettuate con il metodo Spearman e le analisi

statistiche sono state ottenute con il programma Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) per Windows 15.0.

Approvazione del comitato etico

L'utilizzo di animali è stato conforme al Comitato Istituzionale per la Cura e l'Uso degli Animali dell'Università di Firenze, in accordo alla legge ministeriale italiana N. 116/92.

Risultati

Effetti della dieta ricca in lipidi nei conigli

I conigli maschi nutriti con una dieta ricca in lipidi (HFD) per 12 settimane hanno mostrato la presenza di tutte le alterazioni tipiche della sindrome metabolica (SM) nell'uomo, quando confrontati con gli animali di controllo, nutriti con dieta standard per 12 settimane. Come mostrato in tabella 1, i conigli HFD alla 12° settimana hanno mostrato un aumento significativo della concentrazione plasmatica di glucosio, colesterolo e trigliceridi in confronto al tempo zero. Al contrario, nei conigli di controllo, non è stato individuato alcun cambiamento significativo di tali parametri (Tabella 1). I conigli HFD hanno, inoltre, mostrato un aumento significativo ($p < 0,001$) della pressione arteriosa media (MAP), rispetto agli animali di controllo (Tabella 1). L'omeostasi glucidica è stata valutata effettuando un test di tolleranza al glucosio per via orale (OGTT). L'OGTT ha dimostrato nei conigli HFD una ridotta tolleranza al glucosio con un'area sotto la curva del glucosio plasmatico significativamente maggiore (iAUC HFD: $224,8 \pm 7,4$ g/L/tempo) rispetto ai controlli (iAUC controlli: 157 ± 5 g/L/tempo; $p < 0,001$ vs. HFD, Tabella 1). In particolare, i conigli HFD presentavano un accumulo significativo ($p < 0,01$ rispetto al controllo) di tessuto adiposo viscerale (VAT), nonostante il peso corporeo complessivo fosse simile a quello degli animali di controllo ($p < 0,01$ vs controllo dopo normalizzazione con il peso corporeo; Fig. 7 e Tabella 1). Inoltre, abbiamo osservato che il peso del grasso viscerale correlava positivamente con l'espressione nel VAT di geni coinvolti nell'adipogenesi e nel metabolismo lipidico (c/EBP α , FABP4, leptina, DGAT2 e lipoproteina lipasi (LPL)), nella via di segnalazione del monossido di azoto (NO) (NO sintasi endoteliale (eNOS), proteina chinasi G1 (PKG1)), nel trasporto del glucosio (GLUT4, ras homolog gene family member A (RhoA), proteina chinasi associata a Rho, isoforma 1 (Rock1), Rock, isoforma 2 (Rock2), e vimentina (VIM)), nell'infiammazione (MCP1), nella sensibilità agli estrogeni (recettore estrogenico (ER α)), nel rimodellamento del citoscheletro (alfa-actina del muscolo liscio (α SMA)) (Tabella 2). Per valutare gli effetti delle varie

componenti della SM, abbiamo progettato un algoritmo che tiene conto della presenza, come una variabile “dummy” (presente o assente), di uno o più dei seguenti fattori: iperglicemia, elevati livelli di trigliceridi, alti livelli di colesterolo, aumento della pressione sanguigna, e accumulo di grasso viscerale. I cut-off per ciascun fattore sono stati ottenuti dalla media + 2 deviazioni standard (SD) del parametro analizzato, come misurato nei conigli di controllo. La positività per tre o più fattori indica la presenza della SM, in accordo con la definizione nell’uomo (Alberti KG et al., 2009). La prevalenza di tre o più fattori di SM è stata verificata nel 62,9% dei conigli HFD ($p < 0,001$ vs controllo, Tabella 1) e abbiamo osservato che all’aumentare del numero di componenti della SM peggiorava l’intolleranza al glucosio ($r = 0,650$; $p < 0,0001$; Figura 5A). Nei conigli HFD è stata anche individuata una riduzione significativa dei livelli plasmatici di T (T HFD: $1,5 \pm 1,6$ nmol/l) rispetto ai controlli (T controllo: $6,1 \pm 4,4$ nmol/l; $p < 0,001$ vs. HFD 12° settimana) a cui si associava una riduzione significativa delle gonadotropine (LH e FSH, dati non mostrati), suggerendo l’instaurarsi di un ipogonadismo ipogonadotropo. Il peso delle vescichette seminali e dei testicoli, due tessuti bersaglio degli androgeni, si presentava significativamente ridotto negli animali HFD ($491,7 \pm 142$ mg e $3 \pm 0,3$ g; rispettivamente) rispetto ai controlli ($729,4 \pm 207$ mg e $3,5 \pm 0,3$ g; rispettivamente; entrambi $p < 0,001$ vs HFD), dimostrando che la carenza di T, HFD-indotta, rifletteva non solo una condizione biochimica ma anche una condizione biologica di ipogonadismo. Al contrario, i livelli plasmatici di 17β -estradiolo (E_2) sono risultati significativamente aumentati nei conigli HFD ($307,6 \pm 104,1$ pmol/l) rispetto ai controlli ($168,7 \pm 53,6$ pmol/l; $p < 0,001$ vs HFD), suggerendo la presenza di uno sbilanciamento nel rapporto degli ormoni sessuali (Filippi S et al., 2009; Morelli et al., 2012; Morelli A et al., 2013b; Vignozzi L et al., 2012). E’ interessante notare che mentre il ΔT (T alla 12° settimana – T basale) correlava negativamente con il numero di componenti della sindrome metabolica ($r = -0,558$; $p < 0,0001$; Fig. 5B), il ΔE_2 (E_2 alla 12° settimana – E_2 basale) correlava positivamente ($r = 0,492$; $p < 0,0001$; Fig 5C). Associazioni significative sono state anche trovate tra ΔT e/o ΔE_2 e l’espressione di diversi geni nel VAT, come riportato in Fig. 6 e Tabella 3. In particolare, ΔT positivamente, e ΔE_2 negativamente, correlavano con il

trasportatore di glucosio GLUT4 ($r=0,430$, $p<0,0001$ e $r=-0,257$, $p<0,05$, rispettivamente, fig. 6A e B). Al contrario, l'adiponectina, adipochina insulino-sensibilizzante, è risultata altamente testosterone-sensibile ($r=0,464$, $p<0,0001$; Figura 6C), mentre il CA9, marcatore standard della presenza di ipossia, estrogeno-sensibile ($r=0,454$, $p<0,01$; Fig. 6D). L'associazione tra altri geni coinvolti nel turnover dei lipidi e ΔT e/o ΔE_2 sono riassunti nella Tabella 3. L'espressione di BAX, gene apoptosi-correlato, si presentava non solo indotta da ΔT ($r=0,335$, $p=0,01$; Tabella 3), ma anche strettamente associata con l'espressione del recettore androgenico (AR) ($r=0,375$, $p<0,005$; Tabella 4). Abbiamo, poi, analizzato sempre nel VAT l'associazione tra l'espressione genica di AR e quella di numerosi geni coinvolti nel turnover lipidico. Come mostrato nella Tabella 4, sono state trovate associazioni significativamente positive tra AR e geni che regolano l'adipogenesi (PPAR γ , c/EBP α , FABP4, PPAR α , adiponectina e leptina), la via di segnalazione dell'insulina (GLUT4, RhoA, Rock2, STAMP2 e VIM) e la formazione delle goccioline lipidiche (VAMP4, SYNT5, e SNAP23). Al contrario, l'espressione di AR è risultata negativamente associata con il DKK1, gene coinvolto nel commissionamento adipocitario. Al fine di valutare se la HFD potesse avere degli effetti sulla morfologia e sull'ossigenazione del grasso viscerale, abbiamo effettuato l'analisi morfometrica e l'analisi immunohistochimica di sezioni di VAT ottenute dai conigli di controllo e HFD. Come si può osservare in Figura 7, nel caso dei conigli HFD il diametro degli adipociti è risultato significativamente maggiore rispetto a quello degli adipociti dei conigli di controllo ($p<0,01$; Fig. 7F, G e L). Inoltre, il VAT dei conigli HFD si presentava ipossico, come dimostrato dal significativo aumento di positività all'hypoxyprobe ($p<0,0001$ vs controllo; Fig. 7M, N e Q). L'analisi Western blot ha inoltre mostrato che l'espressione della proteina anti-lipolitica perilipina è risultata significativamente aumentata nel VAT dei conigli HFD, rispetto ai conigli di controllo ($p<0,01$; Fig. 8A). Per approfondire lo studio degli effetti dell'HFD sulla via di segnalazione dell'insulina, abbiamo analizzato la localizzazione intracellulare di GLUT4 e il rapporto pAKT/AKT in estratti proteici di VAT. La figura 8B mostra che la traslocazione a membrana di GLUT4 è risultata significativamente ridotta nell'HFD rispetto al gruppo di controllo ($p<0,01$).

Allo stesso modo, il VAT dell'HFD ha mostrato un ridotto rapporto pAKT/AKT rispetto al gruppo di controllo ($p=0,03$; Figura 9). Siamo andati poi a studiare nel VAT dei conigli controllo e HFD i livelli di espressione dell'mRNA del recettore X farnesoide (FXR), specifico recettore nucleare degli acidi biliari (AB) e di TGR5, recettore specifico metabotropico degli AB, considerati attualmente plausibili target per i disordini dell'omeostasi del glucosio e dei lipidi. Nel VAT dei conigli di controllo, la trascrizione del gene FXR è risultata aumentata di cinque volte (mRNA FXR/18S: $55,62 \pm 9,21$) rispetto alla trascrizione del gene TGR5 (mRNA TGR5/18S: $11,42 \pm 1,32$; $p < 0,001$). L'espressione di entrambi i geni non è stata alterata dalla HFD (mRNA FXR/18S: $60,99 \pm 12,76$; mRNA TGR5/18S: $9,97 \pm 1,92$). Nel VAT dei conigli controllo e HFD abbiamo, inoltre, osservato che l'espressione dell'mRNA di FXR, gene implicato non solo nel controllo dell'omeostasi lipidica e glucidica, ma anche nella regolazione della funzione del tessuto adiposo, correlava positivamente con l'espressione dell'mRNA di geni coinvolti nell'adipogenesi (c/EBP α , PPAR γ , FABP4, leptina, adiponectina, recettore alfa attivato di proliferazione dei perossisomi (PPAR α), e la fosfolipasi A2 (PLPA2)), nel trasporto del glucosio (GLUT4, RhoA, Rock1 e Rock2) e nell'infiammazione (interleuchina 6 (IL6) e MCP1) (Tabella 5). I conigli HFD, alla 12^o settimana, hanno inoltre mostrato un aumento significativo della concentrazione plasmatica di aspartato aminotransferasi (AST), di alanina aminotransferasi (ALT) e del peso del fegato (AST: $79,7 \pm 6,9$ U/l; ALT: $46,1 \pm 3,1$ U/l; peso fegato: $4,24 \pm 0,1$ g (% sul peso corporeo totale)) rispetto al controllo (AST: $35,9 \pm 3$ U/l; ALT: $28,5 \pm 1,9$ U/l; peso fegato: $2,9 \pm 0,1$ g (% sul peso corporeo totale); tutti con una significatività con $p < 0,001$), suggerendo la presenza di steatosi epatica. Studi di immunostochimica, utilizzando la colorazione Oil Red O, hanno confermato la presenza di infiltrazione lipidica a livello epatico, omogenea e abbondante, nei conigli HFD rispetto ai conigli di controllo ($p < 0,0001$; Fig. 10A, B e D). Coerentemente, l'espressione del gene PPAR γ , un marcatore specifico di steatosi, è risultata significativamente aumentata nei conigli HFD rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,001$; Fig. 10E). Risultati simili sono stati ottenuti per l'espressione del gene adiponectina ($p < 0,01$ vs controllo; dati non mostrati). I

fegati isolati dai conigli HFD hanno mostrato anche un'intensa immunopositività intraepatocitaria per l'anticorpo anti-TNF α , un marcatore di infiammazione ($p < 0,01$ vs controllo; Fig. 10F, G e I). Come atteso, anche l'espressione dei geni infiammatori, TNF α ($p < 0,001$; Fig. 10L), IL6 (dati non mostrati; $p < 0,05$), e IL10 (dati non mostrati; $p < 0,001$), è risultata significativamente aumentata nel fegato dei conigli HFD rispetto ai conigli di controllo. Siamo quindi andati a studiare a livello epatico l'espressione di FXR e di TGR5, plausibili target per i disordini dell'omeostasi glucidica e lipidica. Nel fegato dei conigli di controllo TGR5 è risultato essere meno espresso di circa 2 unità logaritmiche rispetto a FXR ($29,51 \pm 6,6$ e $6177,92 \pm 851,16$ rispettivamente), la cui espressione veniva indotta significativamente dalla HFD (Tabella 6a). Uno dei più importanti ruoli fisiologici svolto da FXR è quello di proteggere gli epatociti dagli effetti deleteri del sovraccarico di AB, diminuendone la produzione endogena attraverso l'aumento dell'espressione del recettore nucleare small heterodimer partner (SHP) e la conseguente riduzione dell'espressione della colesterolo-7-idrossilasi (Cyp7a1), l'enzima limitante (rate-limiting) nella via biosintetica. In accordo con un'alterazione funzionale a livello epatico, l'espressione di questo enzima era significativamente aumentata nel fegato dei conigli HFD rispetto ai conigli di controllo ($p < 0,01$; Tabella 6a). Inoltre, come mostrato in tabella 6b, l'espressione epatica di FXR correlava positivamente con quella di geni coinvolti nella steatosi (PPAR γ , adiponectina), nel metabolismo epatico (PPAR α , PLPA2), nell'infiammazione (TNF α , IL6, MCP1, COX2, IL8, IL10, CD4, CD8, CD68) e nella fibrosi (α SMA, RhoA, Rock1, Rock2, TGF β , COL1A1, COL3A1, TIMP1, TIMP2, MMP2, MMP9).

Effetti della dieta ricca in lipidi nelle rPAD isolate dal grasso viscerale

Per valutare la presenza di eventuali alterazioni della funzione del tessuto adiposo nel modello sperimentale di SM, abbiamo studiato la capacità differenziativa dei preadipociti (rPAD, rabbit preadipocytes) isolati dal VAT dei conigli HFD e di quelli di controllo. Le cellule rPAD ottenute sono state caratterizzate al passaggio P₁ mediante citofluorimetria a flusso e sono risultate

positive per i marcatori tipici delle cellule staminali mesenchimali (CD105, CD90 e CD106) senza rilevare differenze significative nella percentuale di cellule positive per i singoli marcatori tra le rPAD_{controllo} e le rPAD_{HFD} (Tabella 7a). Inoltre, le rPAD sono risultate negative al marker endoteliale CD31, ai marker ematopoietici CD34 e CD45 e al marker monocitico CD14, escludendo così una possibile contaminazione da parte di queste linee differenziative (dati non mostrati). L'analisi di espressione genica, mediante qRT-PCR, ha dimostrato, inoltre, che il CD90 era il gene più abbondantemente espresso dalle rPAD, seguito da due marcatori di specifico commissionamento adipocitario, DKK1 e FABP4, senza differenze significative tra i gruppi (Tabella 7b). Per determinare se la HFD potesse avere degli effetti sulla capacità di differenziazione adipogenica delle rPAD è stato analizzato l'accumulo dei trigliceridi intracellulari, mediante la colorazione Oil Red O (metodo qualitativo), in seguito al trattamento con DIM per 10 giorni. Tutte le rPAD DIM-indotte hanno mostrato un aumento del contenuto di trigliceridi (goccioline lipidiche) nel citoplasma (Fig.11A). Abbiamo, inoltre, effettuato una valutazione quantitativa del contenuto di trigliceridi utilizzando l'Adipored Assay e abbiamo osservato che l'esposizione al mezzo differenziante induceva un aumento significativo del contenuto di lipidi nelle rPAD_{controllo} ($p < 0,0001$) e nelle rPAD_{HFD} ($p < 0,05$; Fig. 11B). Tuttavia, la percentuale di tale incremento rispetto al basale è risultata significativamente minore nelle cellule rPAD_{HFD} (66%), rispetto a quella osservata nelle cellule rPAD_{controllo} (534%; $p < 0,01$; Fig. 11B). Mediante microscopia a fluorescenza siamo, poi, andati a studiare la percentuale di rPAD che andavano incontro al processo differenziativo. Come mostrato in Fig. 11, la percentuale di cellule Adipored-positive, trattate con o senza DIM, si presentava significativamente più bassa nel rPAD_{HFD} rispetto alle rPAD_{controllo} (entrambe $p < 0,01$; Fig 11C e D) Per valutare l'induzione adipogenica in termini di espressione di geni coinvolti nell'adipogenesi abbiamo analizzato, mediante qRT-PCR, i livelli di mRNA di DKK1, C/EBP α , PPAR γ , FABP4, adiponectina, leptina, CCND1 e CCND3. Come riportato in tabella 8, nelle rPAD_{controllo}, abbiamo osservato una significativa induzione di tutti i geni studiati, in seguito al trattamento con DIM per 10 giorni, rispetto all'espressione basale (tempo 0) ($p < 0,01$). Nelle rPAD_{HFD}, il trattamento con

DIM ha determinato un aumento significativo dei livelli di espressione solo del gene FABP4 rispetto alle cellule non trattate, anche se in misura minore rispetto alle rPAD_{controllo}. Non abbiamo osservato cambiamenti per quanto riguarda l'espressione degli altri geni studiati, che è risultata significativamente ridotta rispetto a quella osservata nelle rPAD_{controllo} ($p < 0,01$ tabella 8). Allo stesso modo, l'espressione dell'mRNA della ciclina D3 (CCND3), che è stata descritta essere predominante durante il differenziamento adipogenico (Hishida T et al., 2008), è risultata significativamente indotta nelle rPAD_{controllo} DIM-trattate ($p < 0,05$), ma non nelle rPAD_{HFD} (Tabella 8). Al contrario, l'espressione dell'mRNA della ciclina D1 (CCND1), che di solito è elevata durante il periodo di espansione mitotica che precede la differenziazione adipogenica (Hishida T et al., 2008) e si riduce nella fase post-mitotica differenziativa, è risultata significativamente aumentata in seguito a DIM nelle rPAD_{HFD} e non nelle rPAD_{controllo} ($p < 0,05$; Tabella 8). La ridotta capacità delle cellule rPAD_{HFD} di accumulare trigliceridi in seguito al trattamento con DIM è stata ulteriormente approfondita analizzando tale capacità, mediante Adipored Assay, in risposta a dosi crescenti di insulina (1, 7,5, 50, 100 e 500 nM) per 4 ore. Come mostrato in fig. 12A, la percentuale di accumulo dei trigliceridi in risposta all'insulina è risultata aumentata in maniera dose-dipendente, con la stessa EC_{50} , in entrambe le rPAD (EC_{50} condivisa = 99 ± 84 nM). Tuttavia, l'effetto massimo (E_{max}) dell'insulina si presentava significativamente ridotto nelle rPAD_{HFD} rispetto alle rPAD_{controllo} ($E_{max} = 111,8 \pm 4,5$ vs $E_{max} = 140 \pm 11$; $p < 0,01$). Il saggio radiometrico di captazione del glucosio marcato in risposta a dosi crescenti di insulina (1, 5, 10 e 50 nM) ha confermato la ridotta risposta all'insulina nelle rPAD_{HFD}, che hanno mostrato un E_{max} significativamente ridotto ($128 \pm 4\%$) rispetto alle rPAD_{controllo} ($273 \pm 3\%$, $p < 0,001$; Fig. 12B). Mediante microscopia confocale, abbiamo analizzato le goccioline lipidiche all'interno della singola cellula. Come mostrato in Fig. 13, nelle rPAD_{HFD} DIM-trattate il numero medio delle goccioline lipidiche era ridotto (Fig. 13B e E; $p < 0,05$), mentre il volume medio era aumentato (Fig. 13B e F; $p < 0,0001$), in confronto alle goccioline delle rPAD_{controllo} DIM-trattate (Fig. 13A, E, F). Utilizzando la qRT-PCR, abbiamo osservato un'espressione significativamente maggiore dei geni coinvolti nella formazione delle goccioline lipidiche e

appartenenti al complesso SNARE (proteina sinaptosomale associata 23 (SNAP23) e syntaxina 5 (SYNT5)) nelle rPAD isolate dai conigli HFD, sia in quelle non trattate che in quelle DIM-indotte, rispetto alle rPAD isolate da conigli di controllo (Tab. 9). Una significativa associazione positiva è stata trovata tra il volume della gocciolina lipidica e l'espressione di SNAP23 ($r=0,928$; $p=0,008$; Fig. 14A) e SYNT5 ($r=0,829$; $p=0,04$; Fig. 14B). Infine, per studiare nelle rPAD DIM-trattate la traslocazione di GLUT-4 dai siti intracellulari (vescicole) alla membrana cellulare, abbiamo analizzato, la localizzazione a membrana di GLUT4 e SNAP23 dopo stimolazione con insulina (100 nM, 5 min; Fig. 15). Utilizzando la microscopia confocale e il WGA, come marcatore di membrana, abbiamo osservato che nelle rPAD_{HFD} l'insulina era meno efficace nello stimolare la traslocazione a membrana di GLUT4 e SNAP23 ($8\pm0,3$ e $19,3\pm0,9\%$ rispettivamente) rispetto alle rPAD_{controllo} ($26,4\pm5,7$ e $24,2\pm0,9\%$ rispettivamente, entrambe $p<0,01$; Fig. 15).

Effetti del trattamento in vivo con testosterone sulle caratteristiche della sindrome metabolica HFD-indotte

Al fine di indagare il ruolo del deficit androgenico nella disfunzione del VAT indotto dalla SM abbiamo trattato un sottogruppo di animali HFD con T (30 mg/Kg/settimana) per l'intero periodo sperimentale di 12 settimane, seguendo un protocollo descritto in precedenza (Filippi S et al., 2009). Tale trattamento ha mantenuto alti i livelli plasmatici di T ($17,6\pm12,5$ nmol/l; $p<0,001$ vs controllo alla 12° settimana; $p<0,001$ vs HFD alla 12° settimana) e bassi quelli estrogenici, ($161,9\pm46,1$ pmol/l; $p<0,001$ vs HFD), prevenendo anche l'atrofia, HFD-indotta, delle vescichette seminali ($1551,5\pm438$ mg; $p<0,001$ vs controllo alla 12° settimana; $p<0,001$ vs HFD alla 12° settimana)). Come previsto nei conigli trattati con T i livelli di LH e FSH sono rimasti soppressi (dati non mostrati), mentre il peso dei testicoli si è ridotto ulteriormente ($1,7\pm0,3$ g; $p<0,001$ vs controllo alla 12° settimana; $p<0,001$ vs HFD alla 12° settimana). Per quanto riguarda gli effetti sui parametri della SM, abbiamo riscontrato che mentre la dislipidemia, indotta da HFD, non veniva modificata dal trattamento con T, la MAP era significativamente inferiore rispetto a quella dei conigli

HFD ($p < 0,001$ vs HFD; Tab. 1), malgrado risultasse più elevata di quella degli animali di controllo ($p < 0,001$ vs controlli; Tab. 1). Il trattamento sostitutivo con T ha completamente normalizzato la tolleranza al glucosio ($p < 0,01$ vs HFD), i livelli di glucosio a digiuno ($p < 0,01$ vs HFD) e ha ridotto drasticamente l'accumulo di tessuto adiposo viscerale ($p < 0,0001$ vs HFD; $p < 0,001$ vs. HFD dopo normalizzazione con il peso corporeo; Tab. 1 e Fig. 7). In realtà, il grasso viscerale non è stato quasi rilevabile in questo gruppo di conigli (Fig. 7C). In generale, il trattamento con T è stato capace di ridurre significativamente la prevalenza della SM (da 62,9% nell'HFD a 18,2% nell'HFD+T, $p < 0,01$). In aggiunta, i conigli trattati con T hanno mostrato una normalizzazione di tutte quelle caratteristiche morfo-funzionali del VAT che erano risultate alterate dalla HFD. Infatti, sia l'ipertrofia che l'ipossia degli adipociti, HFD-indotte, sono state ridotte in maniera significativa dal trattamento con T (entrambe $p < 0,0001$ vs. HFD; Fig. 7 H, L, O e Q). Analogamente, l'espressione della proteina anti-lipolitica perilipina, significativamente aumentata nel VAT dei conigli HFD, è risultata significativamente ridotta in quello dei conigli trattati con T ($p < 0,01$; Fig. 8A), dove abbiamo anche osservato un'aumentata espressione dell'mRNA di STAMP2, gene indotto dagli androgeni e necessario per la via di segnalazione dell'insulina ($p < 0,02$, vs. controllo e HFD; Fig 16). In accordo, il trattamento con T ha normalizzato sia la ridotta traslocazione a membrana di GLUT4 (Fig. 8B) che il rapporto pAKT/AKT (Fig. 9; $p < 0,05$) HFD-indotte, entrambi fondamentali per la sensibilità all'insulina.

Effetti del trattamento in vivo con testosterone nelle rPAD isolate dal grasso viscerale

Per studiare gli effetti del trattamento *in vivo* con T sulla capacità adipogenica dei precursori cellulari del VAT, abbiamo isolato le rPAD dal gruppo HFD+T. Analogamente alle rPAD isolate dai precedenti gruppi descritti, le rPAD_{HFD+T} analizzate, al passaggio 1, mediante citofluorimetria a flusso, sono risultate positive per i marcatori tipici delle cellule staminali mesenchimali (CD105, CD90 e CD106; Tab. 7a), senza rilevare differenze significative

nell'espressione di questi marcatori con gli altri gruppi e, anch'esse, negative al marker endoteliale CD31 e a quelli ematopoietici (CD34, CD45, CD14; dati non mostrati). Inoltre, presentavano un'abbondante espressione del gene CD90, seguito dai due marcatori di commissionamento adipocitario DKK1 e FABP4, senza rilevare differenze significative con gli altri gruppi (Tabella 7b). Mediante la colorazione Oil Red O e l'Adipored assay abbiamo osservato che il trattamento *in vivo* con T è stato in grado di indurre un aumento significativo ($p < 0,0001$) dell'accumulo di goccioline lipidiche in risposta a DIM (dal 66% dell'HFD al 262%, Fig. 11A e B), ripristinando quindi la scarsa capacità adipogenica riscontrata nelle rPAD_{HFD}. Infatti, nelle rPAD_{HFD+T} DIM-indotte la positività all'Adipored, valutata sia come quantità totale che come percentuale di cellule positive, è risultata significativamente aumentata rispetto alle rPAD_{HFD} (entrambe $p < 0,01$, Fig. 11B e D). Inoltre, nelle rPAD_{HFD+T} abbiamo osservato che il trattamento con DIM determinava un aumento statisticamente significativo dell'espressione di tutti i geni adipocita-specifici analizzati (DKK1, c/EBP α , PPAR γ , FABP4, adiponectina; $p < 0,01$ rispetto al relativo tempo 0), con la sola eccezione della leptina (Tab. 8). Analogamente alle rPAD_{controllo}, l'espressione delle cicline CCND3 e CCND1 è risultata, rispettivamente, indotta ($p < 0,01$ rispetto al relativo tempo 0) e non indotta nelle rPAD_{HFD+T} (Tab. 8), suggerendo il corretto iter differenziativo della componente preadipocitaria. Inoltre, il trattamento *in vivo* con T è stato anche in grado di migliorare nelle rPAD_{HFD+T} l'insulino resistenza, HFD-indotta. Infatti, l'Adipored Assay ha mostrato che, nelle rPAD_{HFD+T}, la percentuale di accumulo dei trigliceridi in risposta all'insulina aumentava in maniera dose-dipendente, presentando la stessa EC₅₀ delle altre rPAD (EC₅₀=99 \pm 84 nM; Fig. 12A). L'E_{max} nelle rPAD_{HFD+T} è risultata la stessa di quella osservata nelle rPAD_{controllo} e quindi significativamente maggiore rispetto a quella delle rPAD_{HFD} (E_{max} rPAD_{HFD}= 111,8 \pm 4,5; E_{max} rPAD_{controllo}= E_{max} rPAD_{HFD+T}=140 \pm 11; $p < 0,01$). Analogamente, la valutazione della capacità di uptake del glucosio ha dimostrato che le rPAD_{HFD+T} presentavano la stessa E_{max} delle rPAD_{controllo} (273 \pm 3%, $p < 0,001$ vs. E_{max} rPAD_{HFD}; Fig. 12B). L'analisi delle goccioline lipidiche nelle rPAD_{HFD+T}, mediante microscopia confocale, ha mostrato che il trattamento con T ne normalizzava anche

l'alterata formazione, HFD-indotta, con risultati paragonabili a quelli osservati nelle rPAD_{controllo} (aumento del numero e riduzione delle dimensioni delle goccioline lipidiche; $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ vs HFD, rispettivamente; Fig. 13 C, E, F). Infine, nelle rPAD_{HFD+T} l'analisi di traslocazione a membrana, insulino-stimolata, di GLUT4 e di SNAP23 è risultata comparabile alle rPAD_{controllo} ($29,2 \pm 0,8$ e $27,1 \pm 0,9\%$ rispettivamente; Fig. 15), confermando ulteriormente che il trattamento *in vivo* con T aveva mantenuto una normale sensibilità all'insulina a livello della componente preadipocitaria del VAT.

Effetti del trattamento in vivo con OCA sulle caratteristiche della sindrome metabolica HFD-indotte

Un altro sottogruppo di conigli HFD è stato trattato cronicamente con OCA, un agonista sintetico del recettore FXR implicato non solo nel controllo dell'omeostasi lipidica e glucidica, ma anche nella regolazione della funzione del tessuto adiposo (Rizzo G et al., 2006; Cariou B et al., 2006), al fine di indagare se questo trattamento fosse in grado di migliorare le alterazioni metaboliche indotte dalla SM. Abbiamo osservato che il trattamento con OCA è stato in grado di normalizzare alcune alterazioni tipiche della SM (Tab. 1 e Fig. 7): l'adiposità viscerale (anche dopo normalizzazione con il peso corporeo; $p < 0,001$ vs HFD), i livelli di glucosio a digiuno ($p < 0,01$ vs HFD) e la tolleranza al glucosio (iAUC HFD+OCA= $181,6 \pm 9,6$ g/L/tempo; $p < 0,01$ vs HFD). L'ipertensione e la dislipidemia indotte da HFD sono state ridotte dal trattamento con OCA, ma non in maniera significativa (Tab. 1). Nessun cambiamento migliorativo è stato osservato per quanto riguarda la condizione di ipogonadismo ipogonadotropo indotto dalla HFD (dati non mostrati). In generale, il trattamento con OCA è stato in grado di ridurre significativamente la prevalenza di sindrome metabolica (dal 62,9% nell'HFD all'8,3% nell'HFD+OCA; $p < 0,01$ vs. HFD; Tab. 1). Al fine di indagare se l'effetto benefico di OCA sull'insulino-resistenza, HFD-indotta, fosse mediato dall'attivazione specifica di FXR, un altro sottogruppo di conigli HFD è stato trattato cronicamente con INT-777, l'agonista specifico di TGR5. Al contrario di OCA, il trattamento con INT-777, non ha esercitato alcun effetto

significativo né sulla prevalenza della sindrome metabolica ($p=0,09$ vs HFD; Tab. 1) né sulla glicemia o sull'intolleranza al glucosio inducendo solo una significativa riduzione della quantità di VAT (anche dopo la normalizzazione con il peso corporeo ($p<0,001$ vs HFD)). Il trattamento con OCA ha determinato nel VAT un aumento dell'espressione di FXR (mRNA FXR/18S HFD+OCA: $97,28\pm 6,3$; $p<0,001$ vs controllo; $p<0,01$ vs HFD). Al contrario, il trattamento con INT-777 è stato in grado di aumentare significativamente l'espressione di TGR5 (mRNA TGR5/18S HFD+INT-777: $17,25\pm 0,87$; $p<0,01$ vs controllo; $p<0,05$ vs HFD), ma non quella di FXR (dati non mostrati). Poiché non sono stati osservati cambiamenti significativi per quanto riguarda l'iperglicemia e l'intolleranza al glucosio indotta da HFD nei conigli HFD trattati con INT-777, ulteriori studi non sono stati effettuati su questo gruppo sperimentale. L'analisi morfometrica e l'analisi immunohistochimica di sezioni di tessuto adiposo viscerale hanno mostrato che il trattamento con OCA riduceva sia l'ipertrofia che l'ipossia degli adipociti non soltanto rispetto alla HFD (entrambi $p<0,0001$, Fig. 7 I, L, P e Q) ma anche rispetto al controllo ($p<0,01$; Fig. 7 I, L, P e Q), prevenendo anche l'aumentata espressione, HFD-indotta, della proteina anti-lipolitica perilipina ($p<0,0001$ vs. controllo e HFD; Fig. 8A) e la ridotta traslocazione a membrana di GLUT4, HFD-indotta, indice di insulino-resistenza ($p<0,05$; Fig 8B). Utilizzando la qRT-PCR, nel VAT dei conigli HFD trattati con OCA abbiamo osservato una significativa riduzione dell'espressione di geni VAT-specifici (Tab.10) e, come atteso, un'induzione del gene SHP regolato dall'attivazione di FXR (Tab.10). Per quanto riguarda il metabolismo epatico, il trattamento con OCA non è stato in grado di normalizzare l'aumento significativo, HFD-indotto, della concentrazione plasmatica di AST, ALT e del peso del fegato (dati non mostrati). Tuttavia, il fegato dei conigli trattati con OCA ha mostrato un'aumentata espressione di FXR ($p<0,01$ vs controllo; tab.6A) e SHP ($p<0,0001$ vs controllo e $p<0,01$ vs HFD; tab. 6A) e una significativa riduzione dell'espressione del gene CYP7A1 ($p<0,05$ vs controllo e $p<0,0001$ vs HFD; tab.6A), come previsto dopo l'attivazione di FXR. L'analisi istologica di sezioni di tessuto epatico, effettuata con colorazione Oil Red O, ha mostrato che il trattamento con OCA contrastava nettamente l'accumulo di lipidi indotto dall'HFD, che è rimasto

limitato principalmente alla regione perilobulare occupata dal sistema portale ($p < 0,0001$ vs HFD; Fig. 10C e D). In accordo, l'espressione del marcatore specifico di steatosi, PPAR γ , era normalizzato dal trattamento con OCA ($p < 0,01$ vs HFD; Fig. 10E). Risultati simili sono stati ottenuti per l'espressione del gene adiponectina ($p < 0,01$ vs controllo e $p < 0,01$ vs HFD; dati non mostrati). Inoltre, l'intensa immunopositività intraepatocitaria per l'anticorpo anti-TNF α presente nelle sezioni di fegato dei conigli HFD è stata notevolmente attenuata dal trattamento con OCA ($p < 0,01$ vs HFD; Fig. 10H e I), che ha anche normalizzato l'espressione dei geni infiammatori, TNF α ($p < 0,05$ vs HFD; Fig. 10L) e IL6 (dati non mostrati; $p < 0,05$ vs. HFD) e ha determinato il significativo aumento dell'espressione di IL10 (dati non mostrati; $p < 0,05$ vs HFD).

Effetti del trattamento in vivo con OCA nelle rPAD isolate dal grasso viscerale

Per studiare gli effetti del trattamento *in vivo* con OCA sulla capacità adipogenica dei precursori cellulari del VAT, abbiamo isolato le rPAD dal gruppo HFD+OCA. Analogamente alle rPAD isolate dai precedenti gruppi descritti, le rPAD_{HFD+OCA}, analizzate, al passaggio 1, mediante citofluorimetria a flusso, sono risultate positive per i marcatori tipici delle cellule staminali mesenchimali (CD105, CD90 e CD106, Tab. 7a), senza rilevare differenze significative nell'espressione di questi marcatori con gli altri gruppi e, anch'esse, negative al marker endoteliale CD31 e a quelli ematopoietici (CD34, CD45, CD14; dati non mostrati). Inoltre, presentavano un'abbondante espressione del gene CD90, seguito dal marcatore di commissionamento adipocitario, DKK1, senza rilevare differenze significative con gli altri gruppi (Tabella 7b). È interessante notare che le rPAD_{HFD+OCA}, in condizioni basali, ovvero senza induzione adipogenica *in vitro*, hanno mostrato un significativo aumento dell'espressione di geni adipocita-specifici, come ad esempio FABP4 ($p < 0,001$; Tab. 7b), c/EBP α ($p < 0,01$; dati non mostrati), e PPAR γ ($p < 0,01$; dati non mostrati), rispetto alle rPAD isolate dagli altri gruppi sperimentali. Questa differenziazione adipogenica spontanea osservata nelle rPAD_{HFD+OCA} è stata

ulteriormente studiata mantenendo in coltura le cellule per 10 giorni (Fig. 11). Mediante la valutazione qualitativa (colorazione Oil Red O, Fig.11A) e quella quantitativa (Adipored assay, Fig.11B) abbiamo osservato un aumento del contenuto di trigliceridi (goccioline lipidiche) nel citoplasma delle rPAD_{HFD+OCA} ($p<0,01$) rispetto alle rPAD isolate dai gruppi controllo e HFD. Inoltre, la ridotta percentuale, HFD-indotta, di cellule AdipoRed-positive è stata completamente normalizzata dal trattamento *in vivo* con OCA ($p<0,01$ vs. HFD; Fig. 11C), significativamente superiore anche alla percentuale osservata nel gruppo di controllo ($p<0,01$ vs controllo; Fig. 11C). Analoghi risultati sono stati ottenuti esponendo le rPAD_{HFD+OCA} al trattamento *in vitro* con DIM per 10 giorni (Fig. 11). Inoltre, il trattamento *in vivo* con OCA è stato in grado di normalizzare l'espressione, DIM-indotta, dei geni specifici degli adipociti (DKK1, c/EBP α , PPAR γ , FABP4 e adiponectina), con l'eccezione della leptina ($p<0,01$ vs rispetto al relativo tempo 0; Tab.8). Analogamente alle rPAD_{controllo}, l'espressione della ciclina D3 e della ciclina D1, sono risultate rispettivamente indotta e non indotta nelle rPAD_{HFD+OCA} ($p<0,01$ vs rispetto al relativo tempo 0; Tab.8), suggerendo il corretto differenziamento della componente preadipocitaria. L'effetto del trattamento *in vivo* con OCA sulla sensibilità all'insulina è stata valutata misurando l'assorbimento di 2-deossi-[3H]d-glucosio nelle rPAD DIM-indotte, dopo l'esposizione a concentrazioni crescenti di insulina (Fig. 17). Abbiamo osservato una normalizzazione della sensibilità insulinica (EC_{50} condivisa rPAD_{controllo} e rPAD_{HFD+OCA} = $2,96\pm 0,51$ nM; EC_{50} rPAD_{HFD} = $13,5\pm 6,09$ nM). Inoltre, le rPAD_{HFD+OCA} hanno mostrato un E_{max} significativamente aumentato rispetto alle rPAD_{HFD} (E_{max} rPAD_{HFD+OCA} = $205\pm 3\%$, $p<0,004$), anche se inferiore a quella osservato nei conigli di controllo ($p<0,006$; Fig. 17). Mediante microscopia confocale abbiamo osservato che le rPAD_{HFD+OCA}, DIM-indotte) erano caratterizzate da un aumento del numero ($p<0,0001$ vs HFD; Fig. 13 D ed E) e una riduzione delle dimensioni ($p<0,0001$ vs HFD; Fig. 13 D ed F) delle goccioline lipidiche, normalizzando l'alterata formazione delle goccioline lipidiche indotta dalla HFD. In accordo, il trattamento *in vivo* con OCA è stato anche in grado di normalizzare nelle rPAD, trattate con o senza DIM, l'aumento di espressione, HFD-indotta, dei geni del complesso SNARE, coinvolti nella formazione della

gocciolina lipidica, SNAP23 e SYNT5 (Tab. 9). L'espressione genica di SNAP23 e SYNT5, sia nelle rPAD non trattate che in quelle DIM-indotte isolate da tutti i gruppi, espressa in funzione del volume della gocciolina lipidica, è mostrata in fig. 14 A e B. Una significativa relazione positiva è stata trovata tra il volume della gocciolina lipidica e l'espressione di SNAP23 ($r=0,928$; $p=0,008$; Fig. 14A) e SYNT5 ($r=0,829$; $p=0,04$; Fig. 14B). Le rPAD_{HFD+OCA} hanno mostrato risultati paragonabili a quelli delle rPAD del gruppo di controllo.

Discussione

Oltre alla regolazione del bilancio energetico dell'organismo, i fattori secreti dal tessuto adiposo bianco svolgono un ruolo chiave nella modulazione dei processi metabolici, della sensibilità insulinica e delle risposte immunologiche. La SM è considerata come una conseguenza di un malfunzionamento del tessuto adiposo accumulato in eccesso, essenzialmente a livello viscerale (Després JP, Lemieux I, 2006). L'aumento di dimensione degli adipociti (ipertrofia) e l'infiltrazione macrofagica del tessuto adiposo sembrano essere la causa principale di tale malfunzionamento, ma i meccanismi patogenetici che ne stanno alla base non sono stati ancora completamente identificati. Nel nostro studio abbiamo voluto indagare le alterazioni del tessuto adiposo viscerale (VAT) in un modello sperimentale di SM ottenuto in seguito a trattamento di conigli maschi adulti con una dieta ricca in lipidi (HFD) per 12 settimane. I conigli HFD hanno sviluppato non solo tutte le alterazioni tipiche della SM (iperglicemia, ridotta tolleranza ai glicidi, ipertensione, dislipidemia, accumulo di grasso viscerale), ma anche patologie ad essa strettamente associate come l'ipogonadismo ipogonadotropo e la steatosi epatica. I risultati da noi ottenuti dimostrano che i conigli HFD sono caratterizzati da un accumulo di VAT disfunzionante, che presenta alterazioni morfostrutturali e la cui componente pre-adipocitaria mostra una ridotta capacità differenziativa *in vitro*. Inoltre, questo studio identifica un ruolo cruciale degli androgeni nel contrastare gli effetti deleteri HFD-indotti sia sul metabolismo che, in particolare, sulla funzione del tessuto adiposo. Infatti, il trattamento con T nei conigli HFD si associa non solo ad un miglioramento di alcune componenti della SM (iperglicemia, intolleranza al glucosio, ipertensione, accumulo di grasso viscerale), ma anche ad effetti positivi sulla funzione del VAT, ripristinando il corretto commissionamento dei preadipociti viscerali, attraverso un chiaro effetto positivo sulla loro insulino-sensibilità. Anche se diversi studi precedenti hanno esplorato l'effetto del trattamento *in vitro* con T sulla differenziazione dei preadipociti (Singh R et al., 2003; Gupta V et al., 2008), questo è il primo

studio su un trattamento *in vivo*, prolungato (3 mesi), con T che mostra effetti persistenti su colture di VAT *ex vivo*.

Gli animali con SM HFD-indotta sono caratterizzati da uno squilibrio dei livelli plasmatici degli steroidi sessuali (concomitante diminuzione di T e aumento di E₂) (Filippi S et al., 2009), analogamente a quanto dimostrato nell'uomo (Corona G et al., 2011a; Corona G et al., 2011b), confermando che il nostro modello animale assomiglia molto da vicino al modello umano di SM. Nel nostro studio abbiamo osservato che, mentre la diminuzione degli androgeni (ΔT) correlava negativamente con il numero di componenti della sindrome metabolica, l'aumento degli estrogeni (ΔE_2) correlava positivamente. Inoltre, abbiamo osservato che mentre il ΔT correlava positivamente con l'espressione nel VAT di diversi geni coinvolti nel turnover dei lipidi, come i geni lipogenici (PPAR γ , DGAT2, SREBP2, e STAR), quelli specifici del tessuto adiposo (leptina e adiponectina) e quelli lipolitici (LPL, PPAR α , e HSL), il ΔE_2 correlava negativamente, sottolineando il ruolo deleterio svolto dallo sbilanciamento nel rapporto degli ormoni sessuali MS-indotto sulla funzione del tessuto adiposo e sul metabolismo. Inoltre abbiamo visto che, il trattamento con T nei conigli HFD migliorava l'insulino-sensibilità (riduzione della glicemia, miglioramento della tolleranza al glucosio e riduzione del VAT). In accordo a questi dati, ΔT era anche positivamente associato con l'espressione nel VAT di GLUT4 e adiponectina - due marcatori di insulino-sensibilità - mentre ΔE_2 era negativamente associato con l'espressione di GLUT4. Il ΔE_2 era anche positivamente associato con un altro aspetto negativo HFD-indotto: l'espressione nel VAT del marcatore di ipossia, CA9. L'ipossia del tessuto adiposo rappresenta un meccanismo chiave nel determinare la disfunzione del tessuto adiposo (O'Rourke RW et al., 2011; Blüher M, 2013) e l'insulino-resistenza (Trayhurn P et al., 2008). Nei topi obesi, l'ipossia non è sistemica ma è localizzata, e questo è causato dalla ipoperfusione dovuta alla rapida espansione della massa grassa (Hosogai N et al., 2007; Ye J et al., 2007). In accordo, i nostri risultati, ottenuti dall'analisi morfostrutturale del VAT, mostrano chiaramente che nei conigli con SM, il tessuto espanso è ipertrofico, caratterizzato non solo da una ridotta ossigenazione, ma anche da

un aumento delle dimensioni delle cellule adipose. Infatti, non solo l'accumulo di tessuto adiposo è un fattore di rischio metabolico, ma anche la dimensione degli adipociti è importante, essendo positivamente associata con l'insulino-resistenza (Jacobsson B, Smith U, 1972; Salans LB et al., 1974). Osservazioni relative alla normalizzazione dell'insulino-resistenza in seguito alla perdita di peso, associata con una riduzione delle dimensioni delle cellule adipose, confermano ulteriormente questo concetto (Salans LB et al., 1968). Inoltre, diversi studi dei primi anni '70 hanno dimostrato che gli adipociti grandi ipertrofici presentano, rispetto agli adipociti di minori dimensioni, una minore traslocazione a membrana di GLUT4 e quindi una ridotta capacità di captare il glucosio in seguito alla stimolazione con insulina (Salans LB, Dougherty JW, 1971; Smith U, 1971; Jacobsson B, Smith U, 1972; Olefsky JM, 1976). Coerentemente con questi risultati, il VAT dei conigli HFD ha mostrato una ridotta espressione a membrana di GLUT4 (Huang S, Czech MP 2007) e una ridotta attivazione della via di segnalazione di AKT, insieme ad una aumentata espressione di perilipina 1, la principale proteina anti-lipolitica presente sulla membrana delle goccioline lipidiche intracellulari (Brasaemle DL, 2007). L'aumento di perilipina 1 negli adipociti di grandi dimensioni rispetto a quelli piccoli è stata anche associata ad una ridotta sensibilità all'insulina nelle cellule adipose ipertrofiche (Laurencikiene J et al., 2011).

Nel nostro studio abbiamo inoltre dimostrato che i conigli HFD presentano infiammazione e steatosi a livello epatico, le caratteristiche principali della steatoepatite non alcolica (NASH). Nella SM c'è una stretta relazione tra la disfunzione del VAT e la NASH, e la resistenza all'insulina sembra essere il meccanismo chiave che collega queste due entità cliniche (Cusi K, 2012; Targher G, Byrne CD, 2013). Nel nostro modello animale di SM, l'HFD ha indotto un significativo aumento del peso del fegato e un accumulo di lipidi, abbondante e omogeneo, a livello epatico, alterazioni queste associate ad un'aumentata espressione dei marcatori tipici della steatosi, PPAR γ e adiponectina. I fegati isolati dai conigli con SM erano inoltre chiaramente infiammati, come dimostrato dalla maggiore espressione di TNF α e IL-6, due citochine pro-infiammatorie coinvolte nella transizione da NAFLD (steatosi

epatica non alcolica) a NASH. In accordo, studi recenti hanno dimostrato che l'attivazione delle vie infiammatorie nella NASH è correlata alla tossicità epatica dovuta al sovraccarico di trigliceridi intraepatici (Cusi K, 2012) causato, a sua volta, dalla presenza di un tessuto adiposo disfunzionante (Donnelly KL et al., 2005).

Per approfondire gli effetti della HFD sull'espansione/disfunzione del VAT, abbiamo isolato la componente preadipocitaria indifferenziata (rPAD) dal grasso viscerale dei conigli sperimentali in modo da studiarne le caratteristiche funzionali e la capacità differenziativa. Le rPAD isolate dal VAT dei conigli HFD hanno mostrato una minore capacità di rispondere al mezzo differenziante DIM, e in particolare all'insulina, in termini di sintesi dei trigliceridi e captazione del glucosio. La resistenza all'insulina nelle rPAD_{HFD} è stata dimostrata anche dal mancato aumento di espressione dei geni specifici dell'adipogenesi, quali DKK1, c/EBP α , PPAR γ , FABP4, adiponectina, e leptina. Inoltre, le rPAD_{HFD} DIM-esposte hanno mostrato una prevalente espressione di CCND1 rispetto all'espressione di CCND3 (Fu M et al., 2004; Sarruf DA et al., 2005). Studi recenti hanno dimostrato che le cicline di tipo D sono molecole coinvolte, non sono solo, nella regolazione del ciclo cellulare, ma anche in altri processi cellulari, quali il differenziamento, funzionando come cofattori per diversi fattori di trascrizione. E' stato, infatti, riportato che la CCND1 è in grado di inibire la differenziazione degli adipociti, attraverso la repressione dell'espressione e della transattivazione di PPAR γ (Wang C et al., 2003) e di c/EBP β (Lamb J et al., 2003), mentre la CCND3 è in grado di promuovere la differenziazione degli adipociti, in quanto agisce come co-attivatore di PPAR γ (Sarruf DA et al., 2005). In accordo, una percentuale inferiore di cellule AdipoRed-positive è stata osservata nei conigli HFD. Questi risultati molto interessanti evidenziano, quindi, una ridotta capacità maturativa delle rPAD_{HFD} rispetto alle rPAD_{controllo}. Un ulteriore segno di insulino-resistenza nelle rPAD isolate dai conigli HFD è l'alterata formazione DIM-indotta delle goccioline lipidiche, come rilevato con la microscopia confocale. In particolare, nelle rPAD_{HFD}, rispetto alle rPAD_{controllo}, abbiamo osservato la riduzione della neo-formazione (numero ridotto) e l'alterazione del processo di

fusione (aumento delle dimensioni) delle goccioline lipidiche. Le goccioline lipidiche sono organelli cellulari ricchi di lipidi che regolano lo stoccaggio e l'idrolisi dei lipidi neutri, che aumentano di volume mediante un processo di fusione regolato da proteine facenti parte del complesso SNARE, come SNAP23 e SYNT5 (Boström P et al., 2007). Tra le proteine che formano il complesso SNARE, SNAP23 ha anche un ruolo chiave nella regolazione della sensibilità all'insulina, mediando la fusione delle vescicole contenenti GLUT4 con la membrana cellulare. Tuttavia, in condizioni di dislipidemia (elevato apporto di acidi grassi), SNAP23 è sequestrato nel citoplasma, dove media principalmente la fusione delle goccioline lipidiche, con conseguente aumento della loro dimensione (Boström P et al., 2007). In accordo, nel nostro studio abbiamo osservato che le rPAD_{HFD} sono caratterizzate da una maggiore espressione delle proteine SNAP23 e SYNT5, e che la proteina SNAP23 nelle rPAD_{HFD} è maggiormente espressa a livello citoplasmatico. In aggiunta, sia nelle rPAD non trattate che in quelle trattate con DIM, abbiamo osservato una significativa associazione positiva tra il volume della gocciolina lipidica e l'espressione di SNAP23 e SYNT5. Questo potrebbe rappresentare un possibile meccanismo che associa lo sviluppo di resistenza all'insulina con l'aumento di volume delle goccioline lipidiche.

Il risultato più sorprendente di questo studio è che entrambi i trattamenti, T e OCA, sembrano essere efficaci nel contrastare gli effetti indotti dalla SM. Entrambi i trattamenti, infatti, sono stati in grado di contrastare non solo l'espansione del VAT, ma anche tutte le alterazioni del VAT indotte dalla SM, riducendo la dimensione degli adipociti e l'ipossia, ripristinando il corretto signalling dell'insulina (traslocazione a membrana di GLUT4, rapporto pAKT/AKT), riducendo l'espressione della perilipina 1 e ripristinando la corretta differenziazione della componente preadipocitaria verso un fenotipo metabolico più maturo ed efficiente. Nel nostro studio, nel VAT, l'espressione dell'mRNA sia di PPAR γ che di c/EBP α era positivamente associato con l'espressione di AR, che era anche correlato positivamente con diversi geni coinvolti non solo nell'adipogenesi (FABP4, adiponectina e leptina), ma anche in altre funzioni specifiche del VAT, come ad esempio la formazione delle

goccioline lipidiche, il trasporto del glucosio e la via di segnalazione dell'insulina. In particolare, AR era positivamente associato con l'espressione di SYNT5, SNAP23 e VAMP4, che codificano per proteine appartenenti al complesso SNARE, coinvolte, come abbiamo visto, nel processo di formazione delle goccioline lipidiche (Boström P et al., 2007). Oltre all'associazione positiva con GLUT4, AR presentava anche un'associazione positiva con RhoA, ROCK2, e VIM, tutte proteine coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e necessarie per il traffico intracellulare, insulina-stimolato, delle vescicole contenenti GLUT4 (Hirata Y et al., 2011; Chun KH et al., 2012). Inoltre, una correlazione positiva altamente significativa è stata trovata tra AR e STAMP2, la cui espressione è necessaria per il normale signalling dell'insulina, come dimostrato da Wellen e collaboratori (Wellen KE et al., 2007). Questa proteina è indotta dal TNF α e da stimoli nutrizionali ed è stata caratterizzata nei topi come un contro-regolatore dell'infiammazione e dell'insulino-resistenza (Waki H, Tontonoz P, 2007; Wellen KE et al., 2007). In accordo, Moreno-Navarrete e collaboratori hanno dimostrato che l'espressione genica di STAMP2, nel VAT, era significativamente diminuita nei soggetti obesi, soprattutto in quelli con diabete di tipo 2, ed era associata a disfunzione del tessuto adiposo (Moreno-Navarrete JM et al., 2011). È interessante notare che, STAMP2 è indotto dagli androgeni nelle cellule prostatiche androgeno-regolate (Korkmaz CG et al., 2005). Coerentemente con questi risultati, abbiamo osservato un significativo aumento dell'mRNA di STAMP2 nel VAT dei conigli HFD trattati con T, suggerendo l'attivazione di meccanismi di regolazione androgeno-dipendenti che collegano i segnali infiammatori e nutrizionali con il metabolismo.

Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che un'azione diretta AR-mediata del T sulla funzione del VAT nel modello di SM potrebbe portare a due diversi, apparentemente opposti, effetti biologici: 1) anti-adipogenico, visto il drammatico effetto inibitorio del trattamento con T sull'espansione del VAT indotta dall'HFD (espansione ridotta di 10 volte) e 2) pro-adipogenico, dovuto all'associazione positiva tra l'espressione nel VAT di AR e i geni coinvolti nel turnover dei lipidi. Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali il T esercita questi

effetti *in vivo* sono complessi e solo in parte chiariti. L'effetto anti-adipogenico è in accordo con precedenti studi *in vitro* (Singh R et al., 2003; Singh R et al., 2006; Gupta V et al., 2008) e *in vivo* (topi ARKO), dimostrando chiaramente il ruolo degli androgeni nella riduzione dell'adiposità viscerale (Yanase T et al., 2008) Il T inibisce la differenziazione degli adipociti attraverso la traslocazione nucleare, AR-mediata, della β -catenina e la successiva attivazione della via di segnalazione di Wnt (Rosen ED, MacDougald OA, 2006). Wnt, quando viene attivato, promuove la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali residenti in miociti e osteociti, sopprimendo la loro differenziazione verso la linea adipocitaria, inibendo l'espressione di PPAR γ e c/EBP α , i regolatori centrali della adipogenesi (Christodoulides C et al., 2006; Christodoulides C et al., 2009). In accordo, nel nostro studio abbiamo trovato un'associazione negativa tra l'espressione di AR e l'espressione, nel VAT, di DKK1, gene che inibisce il signalling di Wnt e che normalmente è indotto durante le prime fasi dell'adipogenesi (Christodoulides C et al., 2009). Inoltre, sia ΔT che l'espressione di AR nel VAT sono positivamente associati con l'espressione nel VAT del gene proapoptotico BAX. L'induzione dell'apoptosi BAX-mediata da parte degli androgeni e del suo recettore è stata già dimostrata in diversi sistemi cellulari (Lin Y et al., 2006), ma non è stato del tutto indagato in questo studio. Resta ancora da dimostrare se l'induzione dei processi apoptotici possa essere un ulteriore meccanismo attraverso il quale il T contrasta l'espansione di VAT nei conigli con MS.

Per quanto riguarda i meccanismi attraverso i quali il T può esercitare effetti pro-adipogenici, i nostri risultati nelle rPAD isolate dal VAT dei conigli HFD+T indicano che una conservazione androgeno-dipendente della sensibilità all'insulina (e quindi delle funzioni specifiche degli adipociti) è responsabile del ripristino delle normali caratteristiche morfologiche e funzionali del VAT. Nelle rPAD isolate dai conigli HFD trattati con T, tutte le funzioni tipiche degli adipociti DIM-indotti, come la traslocazione a membrana di GLUT4, l'assorbimento del glucosio, e la sintesi dei trigliceridi insulino-stimolate, sono state preservate e sono risultate paragonabili a quelle osservate nelle rPAD_{controllo}. I nostri dati sono in perfetto accordo con un recente studio nei

primati non umani (Varlamov O et al., 2012). Inoltre, il trattamento con T è stato in grado di ripristinare il corretto turnover della componente preadipocitaria: le rPAD_{HFD+T}, in seguito al trattamento con DIM, hanno infatti mostrato una normale induzione di CCND3 e una percentuale di cellule Adipored-positive paragonabile a quella osservata nelle cellule rPAD_{controllo}. È interessante notare che le rPAD_{HFD+T} erano, inoltre, caratterizzate da una maggiore localizzazione a membrana di SNAP23, nonché da goccioline lipidiche aumentate in numero ma con ridotto volume. Questo risultato dimostra ancora un aumento della sensibilità all'insulina T-mediato.

Il presente studio indica, inoltre, che FXR potrebbe essere un bersaglio per il trattamento delle alterazioni del VAT indotte dalla SM. Negli omogenati di grasso viscerale, infatti, abbiamo trovato che l'espressione di FXR era positivamente associata con l'espressione di geni coinvolti nella segnalazione dell'insulina e nel trasporto del glucosio (GLUT4, RhoA, ROCK1, e ROCK2), nell'adipogenesi (c/EBP α , PPAR γ , FABP4, adiponectina, leptina, PPAR α , e PLPA2), e nell'infiammazione (IL6 e MCP1). Inoltre, abbiamo osservato che il trattamento con OCA non solo ha ridotto in maniera significativa l'incremento del grasso viscerale HFD-indotto, ma ha determinato anche una normalizzazione della dimensione degli adipociti, che è risultata significativamente ridotta, anche se confrontata con quella osservata nei conigli di controllo. Il trattamento con OCA ha anche completamente normalizzato la traslocazione a membrana di GLUT4, l'ossigenazione del VAT e l'espressione della perilipina 1. In accordo con questi dati, il trattamento con OCA ha anche ridotto l'espressione di diversi geni associati con l'accumulo del grasso viscerale, come i geni coinvolti nel processo infiammatorio (MCP1), nella sensibilità steroidea (ER α), nell'adipogenesi (c/EBP α , FABP4, e leptina), nella lipogenesi (DGAT2 e LPL), nella segnalazione di NO (eNOS e PKG), nel trasporto del glucosio (GLUT4, RhoA, ROCK1, ROCK2, e VIM) e nel rimodellamento del citoscheletro (α SMA). Contemporaneamente, OCA è stato in grado di migliorare anche l'intolleranza al glucosio e l'iperglicemia a digiuno HFD-indotta. La normalizzazione del peso del grasso viscerale e della relativa morfologia osservata nel gruppo di conigli HFD trattati con OCA

apparentemente è in contrasto con i noti effetti pro-adipogenici del farmaco (Rizzo G et al., 2006). Topi knockout per FXR hanno, infatti, una massa grassa ridotta e soprattutto adipociti di dimensioni minori (Cariou B et al., 2006). Tuttavia, è ipotizzabile che nel nostro modello animale di SM gli effetti del trattamento *in vivo* con un agonista del recettore FXR agiscano a vari livelli e che la normalizzazione del tessuto adiposo viscerale sia da considerarsi come una conseguenza del miglioramento dei parametri metabolici (iperglicemia e intolleranza glucidica indotte dalla HFD) osservato in seguito al trattamento con OCA. L'aumentata insulino-sensibilità potrebbe, infatti, essere responsabile della preservazione del fenotipo di VAT 'metabolicamente sano', nonché del miglioramento delle anomalie epatiche. I nostri dati, che dimostrano che il trattamento con OCA può ridurre la steatosi e l'infiammazione a livello epatico HFD-indotta, così come i livelli sierici di ALT, sono in linea con risultati precedenti ottenuti in un modello di ratto Zucker fa/fa insulino-resistente (Cipriani S et al., 2010). In accordo a questi dati, Renga e collaboratori hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di lipidi epatici correla con l'aumento della sensibilità all'insulina negli adipociti (Renga B et al., 2010).

In questo studio abbiamo, inoltre, dimostrato che anche il trattamento *in vivo* con OCA è in grado di ripristinare la differenziazione dei preadipociti verso un fenotipo metabolico più maturo ed efficiente, documentato dal loro maggiore contenuto di gocce lipidiche di piccolo volume, associato ad una ridotta espressione dei fattori noti per orchestrare la loro fusione, come il complesso SNARE, compreso SNAP23. Coerentemente con l'effetto positivo di OCA sulla disfunzione del VAT HFD-indotta, le rPAD, DIM-esposte, isolate dai conigli HFD trattati con OCA hanno mostrato una maggiore capacità di rispondere all'insulina, in termini di assorbimento del glucosio e di capacità degli adipociti di andare incontro al processo differenziativo, se confrontato con le rPAD isolate dai conigli HFD. Inoltre, nelle rPAD_{HFD+OCA}, tutte le altre caratteristiche tipiche degli adipociti DIM-indotti, tra cui la sintesi dei trigliceridi, l'espressione di geni specifici degli adipociti (DKK1, c/EBP α , PPAR γ , FABP4, adiponectina, e leptina), la maturazione dei preadipociti

(CCND1 e CCND3), e il numero di cellule che vanno incontro al processo differenziativo (colorazione AdipoRed), sono risultate normalizzate. È interessante notare che gli effetti pro-adipogenici di OCA sono evidenziabili indipendentemente dalla induzione differenziativa *in vitro*. Infatti, le rPAD_{HFD+OCA} non trattate con DIM hanno mostrato una maggiore espressione dei geni specifici dell'adipogenesi (come c/EBP α , PPAR γ e FABP4), dell'accumulo di trigliceridi e della percentuale di cellule differenzianti, anche quando confrontati con le rPAD_{controllo}. Nel complesso, i nostri risultati sono in linea con precedenti osservazioni che mostrano la capacità di OCA di migliorare la sensibilità all'insulina e la differenziazione degli adipociti, sia *in vivo* (Cariou B et al., 2006; Ma K et al., 2006; Zhang Y et al., 2006) che *in vitro*, come nella linea cellulare preadipocitaria 3T3-L1 (Cariou B et al., 2006; Rizzo G et al., 2010). Nel presente studio, abbiamo dimostrato che la riduzione del peso del VAT è associato con la presenza di adipociti che sono di dimensioni più piccole. *In vitro*, abbiamo dimostrato che i preadipociti isolati dai conigli HFD+OCA sono in grado di differenziarsi in adipociti con gocce lipidiche multiloculari e con una maggiore sensibilità all'insulina. È interessante notare che queste caratteristiche fenotipiche sono state riconosciute per caratterizzare gli adipociti metabolicamente sani, caratterizzati da un maggiore consumo di energia, attraverso l'ossidazione degli acidi grassi liberi, e, di conseguenza, dalla riduzione della massa grassa e dell'insulino-resistenza (Timmons JA et al., 2007). L'aumento dell'ossidazione degli acidi grassi liberi potrebbe essere il meccanismo alla base della riduzione della massa grassa viscerale osservata nei conigli HFD trattati con OCA. In linea con questa ipotesi, numerosi studi recenti hanno dimostrato che l'attivazione di FXR migliora la spesa energetica, riducendo i livelli circolanti di acidi grassi liberi e l'insulino-resistenza (Fiorucci S et al., 2010). È interessante notare che OCA è stato valutato in tre studi clinici di fase II, di cui uno in pazienti con diabete di tipo 2 e NAFLD (Adorini L et al., 2012; Mudaliar S et al., 2013), dove ha dimostrato un miglioramento sistemico della sensibilità all'insulina e un miglioramento dell'assorbimento del glucosio sia a livello epatico che periferico. In seguito al trattamento con OCA, è stata anche osservata una significativa diminuzione dei livelli dei biomarcatori di fibrosi a livello epatico

(Adorini L et al., 2012; Mudaliar S et al., 2013). Inoltre, dati ottenuti dal recente studio FLINT (The Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment), uno studio clinico multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato con placebo, effettuato su pazienti con steatoepatite non alcolica, non cirrotica, hanno dimostrato che il trattamento con OCA migliora le caratteristiche istologiche della steatoepatite non alcolica, tra cui la steatosi epatica, l'infiammazione e la fibrosi (Neuschwander-Tetri BA et al., 2014). I nostri risultati indicano che l'effetto benefico di OCA sulla resistenza all'insulina HFD-indotta è mediata dall'attivazione specifica di FXR, piuttosto che TGR5, sia a livello epatico che a livello del VAT. Infatti, abbiamo scoperto che 1) il trattamento dei conigli HFD con l'agonista selettivo di TGR5, INT-777, non ha alcun effetto sull'intolleranza al glucosio e sull'aumentato della glicemia a digiuno HFD-indotte; 2) l'espressione di TGR5 nel fegato e nel VAT è nettamente inferiore rispetto a FXR; 3) l'espressione dei geni coinvolti nell'attivazione di FXR, SHP e Cyp7a1, è rispettivamente indotta e non indotta dal trattamento con OCA, come previsto dopo l'attivazione di FXR (Rizzo G et al., 2006). Questi dati, insieme alla nota maggiore attività agonistica di 200 volte di OCA per FXR rispetto a TGR5 (Rizzo G et al., 2010), conferma che tutti gli effetti di OCA osservati sul nostro modello animale di SM HFD-indotto sono selettivamente mediati dall'attivazione di FXR.

Nel complesso, le nostre osservazioni non solo rafforzano l'evidenza di un effetto positivo dei trattamenti, T e OCA, sulla via di segnalazione dell'insulina negli adipociti, ma indicano anche che la loro azione è persistente, come una sorta di 'memoria metabolica', durante gli esperimenti *in vitro*. Quindi, il coinvolgimento di meccanismi epigenetici potrebbe essere previsto e deve essere oggetto di indagini in studi futuri. Rimane da chiarire quale sia il meccanismo attraverso cui si realizzano questi effetti benefici, soprattutto visto che il T, ovvero l'attivazione di AR, è noto esercitare effetti anti-adipogenici (Singh R et al., 2006; Gupta V et al., 2008). Pertanto, le nostre osservazioni potrebbero essere imputabili a effetti indiretti del T, secondari al miglioramento di qualcuna delle alterazioni metaboliche indotte dalla HFD, ma

non possiamo escludere l'esistenza di azioni dirette, AR-mediate, sulla cellula adiposa. La possibilità che si tratti di effetti indiretti è supportata dalle analoghe osservazioni relative al trattamento cronico dei conigli HFD con l'agonista di FXR, OCA, una sostanza nota esercitare effetti opposti rispetto al T sulla differenziazione adipocitaria. Infatti, l'attivazione di FXR favorisce l'adipogenesi sia *in vivo* (Cariou B et al., 2006) che *in vitro* (Rizzo G et al., 2006).

In conclusione, il nostro studio effettuato in un modello sperimentale di SM aggiunge nuove informazioni circa il legame che esiste tra ipogonadismo e obesità viscerale, alterazioni entrambe associate allo sviluppo di SM e rischio cardiovascolare. In particolare, i nostri risultati suggeriscono che i conigli HFD sono caratterizzati da un accumulo di VAT disfunzionante, in cui il normale processo differenziativo sembra essere danneggiato, a causa della compromissione della via di segnalazione dell'insulina. Il trattamento *in vivo* sia con T che con OCA sembra essere capace di preservare la funzione del VAT attraverso il mantenimento dell'insulino-sensibilità, che, a sua volta, consente il corretto commissionamento della componente preadipocitaria e un normale turnover cellulare. Questi effetti potrebbero essere visti come un fattore di protezione nei confronti dell'espansione ipertrofica del VAT che diventa disfunzionante, determinando le conseguenze metaboliche deleterie tipiche della SM.

Tabelle

Tabella 1.

Variazioni dei parametri metabolici nei diversi gruppi sperimentali al tempo 0 e alla 12° settimana.

	controllo (n=38)	HFD (n=36)	HFD+T (n=19)	HFD+OCA (n=18)	HFD+INT-777 (n=6)
Peso corporeo (g)					
Tempo 0	3258,6±63,0	3290,4±42,0	3175±300	3361,7±52,4	3266,6±107,5
12° settimana	3909,9±38,3***	3745,3±34,8***	3804,5±266,3***	3663,1±79,3*	3404±106,4°
Glucosio (g/L)					
Tempo 0	1,18±0,04	1,29±0,03	1,2±0,2	1,25±0,06	1,24±0,2
12° settimana	1,25±0,03	1,94±0,07*****	1,4±0,3*^^	1,40±0,06^^	2,03±0,3*°
iAUC glucosio (g/L/tempo)					
12° settimana	157,0±5,0	224,8±7,4°	177±25,3^^	181,6±9,6^^	217,1±15,7°
Colesterolo (mg/dL)					
Tempo 0	36,9±2,1	44,1±2,0	49,5±13,5	36,8±2,0	31,2±1,6
12° settimana	42,8±3,0	1447,6±64,7 *****	1244,6±228,3*****	1242,1±91,5*****	1711±134,6*****
Trigliceridi (mg/ml)					
Tempo 0	81,5±4,4	86,6±4,1	91,4±29	76,8±5,7	93,83±9,9
12° settimana	96,5±4,5	304,5±25,1*****	293,1±113,5*****	230,7±36,6***	156,8±30,5
MAP (mmHg)					
12° settimana	91,5±2,2	133,4±3,5°	113,5±8,5°^^	129,2±4,3°	143,2±3,2°
VAT (g. % sul peso corporeo totale)					
12° settimana	0,92±0,05	1,09±0,04°	0,1±0,05°^^	0,41±0,06°^^	0,51±0,09°^^
Prevalenza di MetS (%)	0	62,9°	18,2%^^	8,3^^	100°

I valori riportati sono la media ± SEM di n animali per ciascun gruppo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 rispetto ai propri valori al tempo 0; °p<0,05, °°p<0,01, °°°p<0,001 vs controllo alla 12° settimana; ^p<0,05, ^^ p<0,01, ^^p<0,001 vs HFD alla 12° settimana. MAP = pressione arteriosa media; iAUC= incremental area under the curve (incremento dell'area sotto la curva relativa ai livelli di glicemia durante il test di tolleranza al glucosio per via orale).

Tabella 2.

Associazione tra il peso del grasso viscerale e l'espressione dell'mRNA di geni specifici del VAT.

	r	valore p	n animali
<i>Adipogenesi</i>			
<i>c/EBPα</i>	0,296	0,05	52
<i>FABP4</i>	0,392	<0,0001	70
<i>leptina</i>	0,396	<0,0001	70
<i>Lipogenesi</i>			
<i>DGAT2</i>	0,379	0,001	68
<i>LPL</i>	0,240	0,05	71
<i>Signalling dell'NO</i>			
<i>eNOS</i>	0,291	0,01	74
<i>PKG1</i>	0,249	0,05	74
<i>Trasporto del glucosio</i>			
<i>GLUT4</i>	0,378	<0,0001	74
<i>RhoA</i>	0,373	<0,0001	74
<i>Rock1</i>	0,325	0,01	72
<i>Rock2</i>	0,289	0,01	71
<i>VIM</i>	0,258	0,05	68
<i>Inflamazione</i>			
<i>MCP1</i>	0,374	0,001	74
<i>Sensibilità agli estrogeni</i>			
<i>ERα</i>	0,362	0,01	57
<i>Rimodellamento del citoscheletro</i>			
<i>αSMA</i>	0,316	0,05	61

I coefficienti di correlazione (r) e il livello di significatività (valore p) sono derivati da un'analisi univariata.

Tabella 3.

Associazione tra ΔT o ΔE_2 e l'espressione dell'mRNA di geni lipogenici e lipolitici nel VAT.

	ΔT		ΔE_2	
	r	valore p	r	valore p
<i>Geni lipogenici</i>				
<i>PPARγ</i>	0,343	0,007	-0,178	0,178
<i>adiponectina</i>	0,464	<0,0001	-0,239	0,071
<i>leptina</i>	0,414	0,001	-0,223	0,096
<i>DGAT2</i>	0,449	0,001	-0,425	0,002
<i>SREBP2</i>	0,474	0,003	-0,470	0,003
<i>STAR</i>	0,390	0,025	-0,566	0,001
<i>Geni lipolitici</i>				
<i>LPL</i>	0,508	<0,0001	-0,332	0,011
<i>PPARα</i>	0,275	0,032	-0,122	0,359
<i>HSL</i>	0,283	0,049	-0,482	<0,0001
<i>Gene coinvolto nell'apoptosi</i>				
<i>BAX</i>	0,335	0,01	-0,189	0,155

I coefficienti di correlazione (r) e il livello di significatività (valore p) sono derivati da un'analisi univariata.

Tabella 4.

Associazione tra l'espressione dell'mRNA di AR e geni specifici del VAT.

	r	valore p
<i>Adipogenesi</i>		
<i>DKK1</i>	-0,372	0,004
<i>PPARγ</i>	0,560	<0,0001
<i>c/EBPα</i>	0,620	<0,0001
<i>FABP4</i>	0,610	<0,0001
<i>adiponectina</i>	0,281	0,033
<i>leptina</i>	0,308	0,020
<i>PPARα</i>	0,572	<0,0001
<i>Via di segnalazione dell'insulina</i>		
<i>GLUT4</i>	0,291	0,026
<i>RhoA</i>	0,354	0,007
<i>Rock2</i>	0,315	0,017
<i>STAMP2</i>	0,474	<0,0001
<i>VIM</i>	0,571	<0,0001
<i>Formazione delle goccioline lipidiche</i>		
<i>VAMP4</i>	0,535	<0,0001
<i>SYNT5</i>	0,359	0,010
<i>SNAP23</i>	0,476	<0,0001
<i>Apoptosi</i>		
<i>BAX</i>	0,375	0,004

I coefficienti di correlazione (r) e il livello di significatività (valore p) sono derivati da un'analisi univariata.

Tabella 5.

Associazione tra l'espressione dell'mRNA di *FXR* e geni specifici del VAT.

	r	valore p	n animali
<i>Adipogenesi</i>			
<i>c/EBPα</i>	0,444	0,005	39
<i>PPARγ</i>	0,449	<0,0001	59
<i>FABP4</i>	0,378	0,004	56
<i>adiponectina</i>	0,405	0,002	58
<i>leptina</i>	0,315	0,017	57
<i>PPARα</i>	0,481	<0,0001	59
<i>PLPA2</i>	0,359	0,012	48
<i>Via di segnalazione dell'insulina</i>			
<i>GLUT4</i>	0,347	0,007	60
<i>RhoA</i>	0,280	0,030	60
<i>Rock1</i>	0,275	0,034	60
<i>Rock2</i>	0,375	0,003	60
<i>Infiammazione</i>			
<i>IL6</i>	0,428	0,001	56
<i>MCP1</i>	0,334	0,013	55

I coefficienti di correlazione (r) e il livello di significatività (valore p) sono derivati da un'analisi univariata.

Tabella 6.

a) Espressione dell'mRNA di geni coinvolti nell'attivazione di FXR nel fegato dei gruppi controllo, HFD, HFD+OCA.

	FXR	SHP	Cyp7a1
controllo (n=31)	100±6,6	100±12,05	100±14,35
HFD (n=36)	131,4±11*	188,4±42,1	300,4±75**
HFD+OCA (n=18)	145,1±10,6**	336,8±58,7***°	81±34,7*°°

L'espressione dell'mRNA di geni coinvolti nell'attivazione di FXR (FXR, SHP, Cyp7a1) nel fegato misurata mediante qRT-PCR. I dati sono espressi in percentuale rispetto al controllo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,0001 vs. controllo; °p<0,01, °°p<0,0001 vs. HFD

b) Associazione tra l'espressione dell'mRNA di FXR e di altri geni coinvolti nella steatosi, nel metabolismo, nell'infiammazione e nella fibrosi nel fegato.

	r	valore p	n animali
Steatosi			
<i>PPARγ</i>	0,623	<0,0001	69
<i>adiponectina</i>	0,324	0,007	67
Metabolismo			
<i>PPARα</i>	0,419	<0,0001	69
<i>PLPA2</i>	0,429	0,006	52
Infiammazione			
<i>TNFα</i>	0,377	0,002	67
<i>IL6</i>	0,291	0,017	67
<i>MCP1</i>	0,382	0,001	69
<i>COX2</i>	0,388	0,001	68
<i>IL8</i>	0,509	<0,0001	61
<i>IL10</i>	0,455	<0,0001	61
<i>CD4</i>	0,248	0,046	65
<i>CD8</i>	0,395	0,003	53
<i>CD68</i>	0,445	<0,0001	65
Fibrosi			
<i>αSMA</i>	0,563	<0,0001	62
<i>RhoA</i>	0,636	<0,0001	66
<i>Rock1</i>	0,569	<0,0001	66
<i>Rock2</i>	0,421	0,001	64
<i>TGFβ</i>	0,496	<0,0001	63
<i>COL1A1</i>	0,412	0,002	53
<i>COL3A1</i>	0,505	<0,0001	53
<i>TIMP1</i>	0,530	<0,0001	63
<i>TIMP2</i>	0,672	<0,0001	50
<i>MMP2</i>	0,641	<0,0001	50
<i>MMP9</i>	0,551	<0,0001	49

I coefficienti di correlazione (r) e il livello di significatività (valore p) sono derivati da un'analisi univariata.

Tabella 7.

Caratterizzazione delle rPAD al passaggio 1 isolate da ciascun gruppo sperimentale.

a) Caratterizzazione immunofenotipica mediante citofluorimetria a flusso.

	CD105	CD90	CD106
controllo (n=6)	35,3±6,6	20,8±4,06	0,27±0,14
HFD (n=6)	43,7±4,7	19,0±4,04	0,36±0,09
HFD + T (n=5)	59,7±12,7	14,8±3,4	0,18±0,01
HFD + OCA (n=5)	41,5±9,1	21,7±5,7	0,6±0,2

b) qRT-PCR di CD90, DKK1 e FABP4

	CD90		DKK1		FABP4	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
controllo (n=6)	1,5E+05	0,6E+05	1,9E+03	0,3E+03	2,0E+04	0,9E+04
HFD (n=6)	0,9E+05	0,3E+05	2,5E+03	0,7E+03	0,4E+04	0,1E+04
HFD+T (n=5)	1,4E+05	0,4E+05	5,8E+03	1,0E+03	0,4E+04	0,1E+04
HFD + OCA (n=5)	1,2E+05	0,3E+05	5,4E+03	2,4E+03	4,0E+04*	0,3E+04

a) Le cellule sono state marcate con anticorpi di superficie e analizzati mediante citometria a flusso. I dati sono espressi come percentuale di cellule marker-positive e sono riportati come media ± SEM di n diverse preparazioni rPAD da ciascun gruppo sperimentale. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata tra i gruppi; b) qRT-PCR di CD90, DKK1 e FABP4. I dati sono riportati come media ± SEM di n diverse preparazioni rPAD da ciascun gruppo sperimentale. * p<0,001 vs a tutti gli altri gruppi.

Tabella 8.

Effetto del trattamento con DIM sull'espressione di geni adipocita-specifici nelle cellule rPAD di ciascun gruppo.

	controllo	HFD	HFD+T	HFD+OCA
<i>Geni adipocita-specifici</i>				
DKK1	6,4±2**	1.5±0.3°	3,6±2**	13,6±2,1**
c/EBPα	2,3±0,5**	1.2±0.3°	2,4±0,4**	2,5±0,5**
PPARγ	2,5±0,5**	1.1±0.3°	1,8±0,7**	1,7±0,1**
FABP4	20,6±7**	5,3±1,1**	14,3±8**	10,9±3,6**
adiponectina	9,5±4,3**	0,9±0,1°	3,8±1,5**	2,6±0,7**
leptina	8,7±2,6**°	0,7±0,2	1,1±1,4	1,8±0,4
CCND1	0,8±0,3	2,6±0,7*	0,3±0,1	1,1±0,1
CCND3	2,3±0,5*^	1,2±0,3	4,8±2,6**^^	1,9±0,3**^^

L'espressione relativa dell'mRNA dei geni adipocita-specifici è stata valutata utilizzando la qRT-PCR nelle rPAD non trattate (tempo 0) e in quelle DIM-esposte isolate da tutti i gruppi sperimentali (cinque differenti esperimenti, ciascuno eseguito in triplicato utilizzando una diversa preparazione cellulare per gruppo). I dati sono stati calcolati secondo il metodo comparativo del C_t, utilizzando la subunità 18S dell'RNA ribosomiale come gene di riferimento per la normalizzazione. I risultati sono espressi in fold change rispetto al tempo 0. *p<0,05, **p<0,01 vs relativo tempo 0; °p<0,01 vs a tutti gli altri gruppi; ^p<0,05; ^^p<0,01 vs relativa CCND1.

Tabella 9.

Effetto del trattamento *in vivo* con OCA sull'espressione dell'mRNA dei geni coinvolti nel processo di formazione delle goccioline lipidiche (SNAP23 and SYNT5).

rPAD	SNAP23	SYNT5
controllo		
non trattate	1,90±0,20	4,22±0,62
DIM	2,09±0,23	3,88±0,36
HFD		
non trattate	2,46±0,21*	9,90±2,44**
DIM	2,95±0,44*	12,02±3,33**
HFD+OCA		
non trattate	1,70±0,13 ^{°°}	3,52±0,39 ^{°°}
DIM	2,09±0,19 [°]	4,38±1,09 [°]

L'espressione relativa dell'mRNA dei geni del complesso SNARE coinvolti nel processo di formazione delle goccioline lipidiche (SNAP23 and SYNT5) è stata valutata utilizzando la qRT-PCR nelle rPAD non trattate (tempo 0) e in quelle DIM-esposte isolate dai conigli controllo, HFD e HFD+OCA (6 differenti preparazioni rPAD per ciascun gruppo sperimentale). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,0001 vs controllo; °p<0,05, °°p<0,01 vs HFD.

Tabella 10.

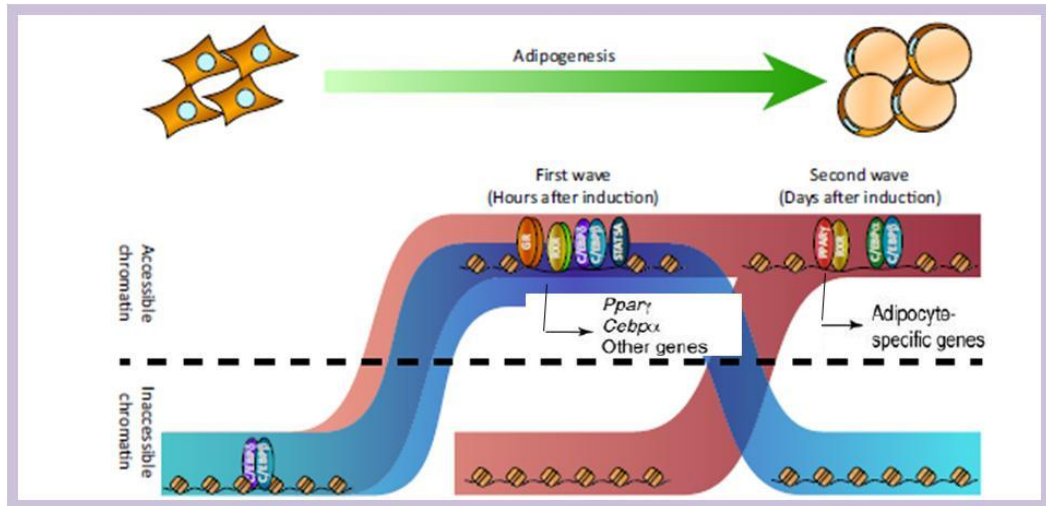
Effetto del trattamento con OCA sull'espressione dell'mRNA dei geni specifici del VAT.

Geni	% variazione, HFD+OCA vs HFD
SHP	274,3±92,6 **
FABP4	- 47±11,3 **
c/EBPα	- 61,2±12,3 ***
LPL	- 49,6±7,9 *
leptina	- 58,2±23 *
GLUT4	- 31,7±8,7 *
IRS-1	- 32±3,9 **
RhoA	- 37±8.2 **
Rock1	- 34,8±7,8 **
Rock2	- 56±16.1 **
DGAT2	- 63,5±17,3 *
PR	- 42,3±8,1 *
VIM	- 17,7±2,3
αSMA	- 48,8±15,8
MCP1	- 13,7±5,1
eNOS	- 4,8±1
ERα	- 22±5,8
PKG1	- 21,4±4,7

I dati sono espressi come percentuale di variazione vs HFD. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs HFD.

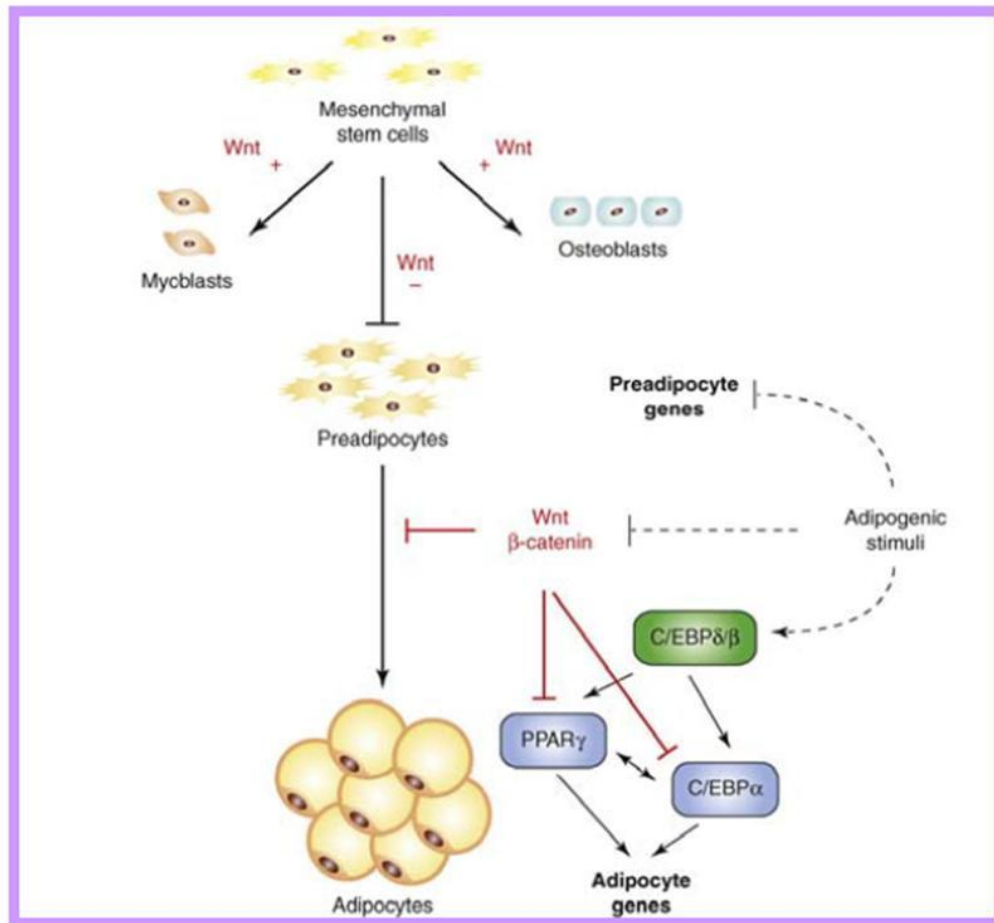
Figure

Figura 1.



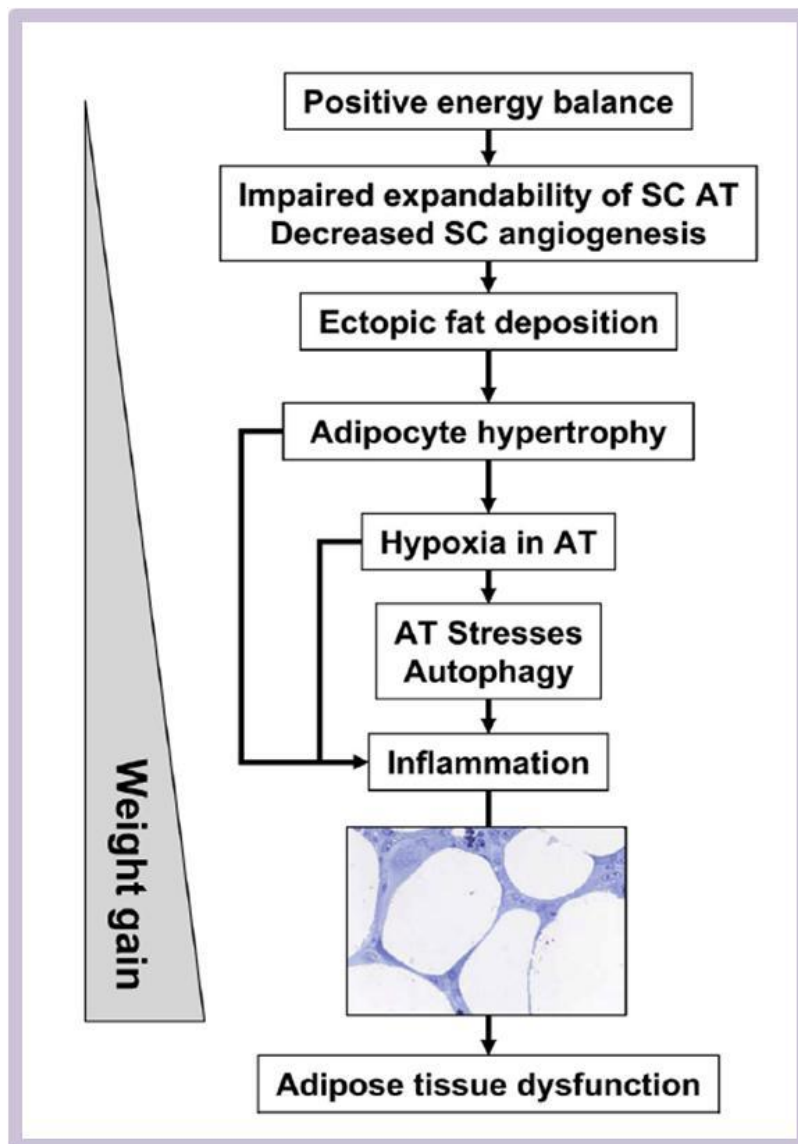
Schema dell'attività trascrizionale di PPAR γ e C/EBP durante l'adipogenesi (da "PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond" Lefterova MI et al., Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM, 25(6):293-302, 2014, modificata).

Figura 2.



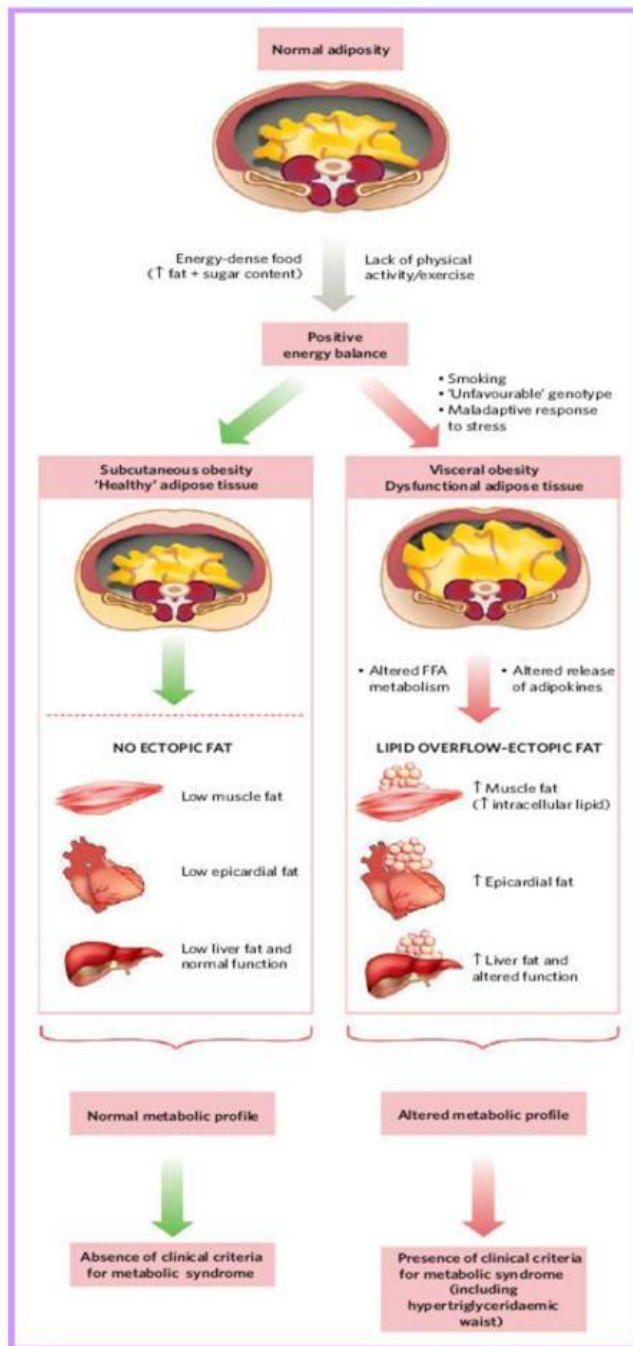
La pathway canonica di Wnt (da “Adipogenesis and WNT signalling” Christodoulides C. et al., Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM, 2008, modificata).

Figura 3.



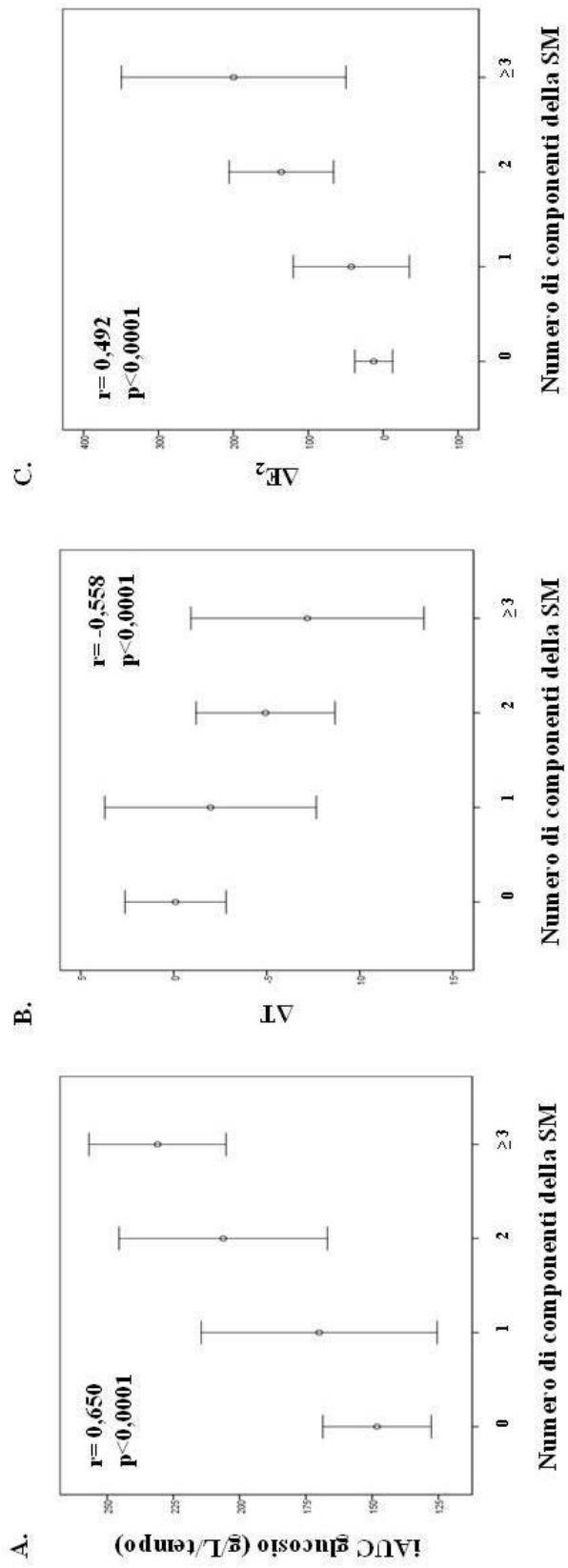
Modello per lo sviluppo della disfunzione del tessuto adiposo (da “Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases” Blüher M, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, modificata).

Figura 4.



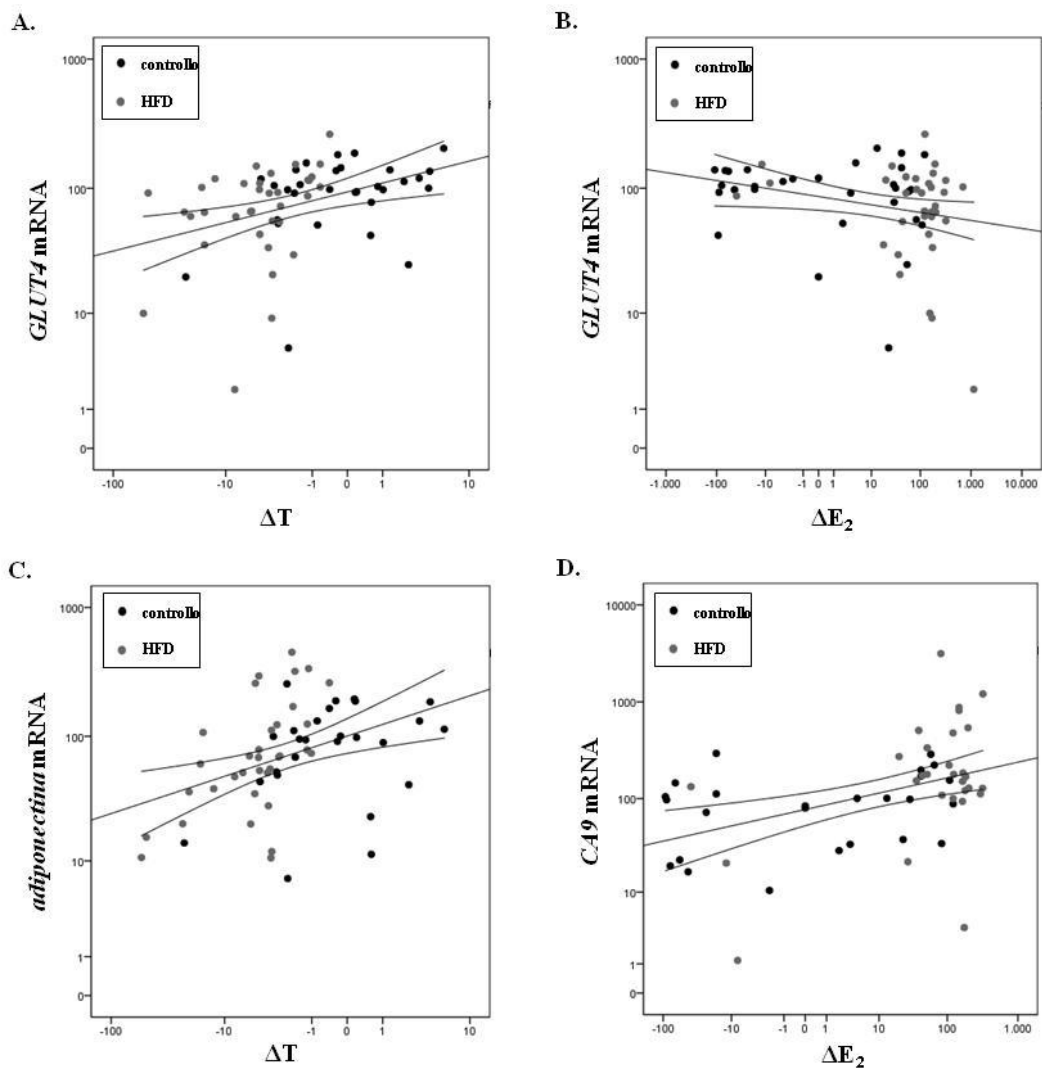
Deposizione ectopica del grasso (da “Abdominal obesity and metabolic syndrome” Depres JP e Lemieux I, Nature, 2006, modificata).

Figura 5.



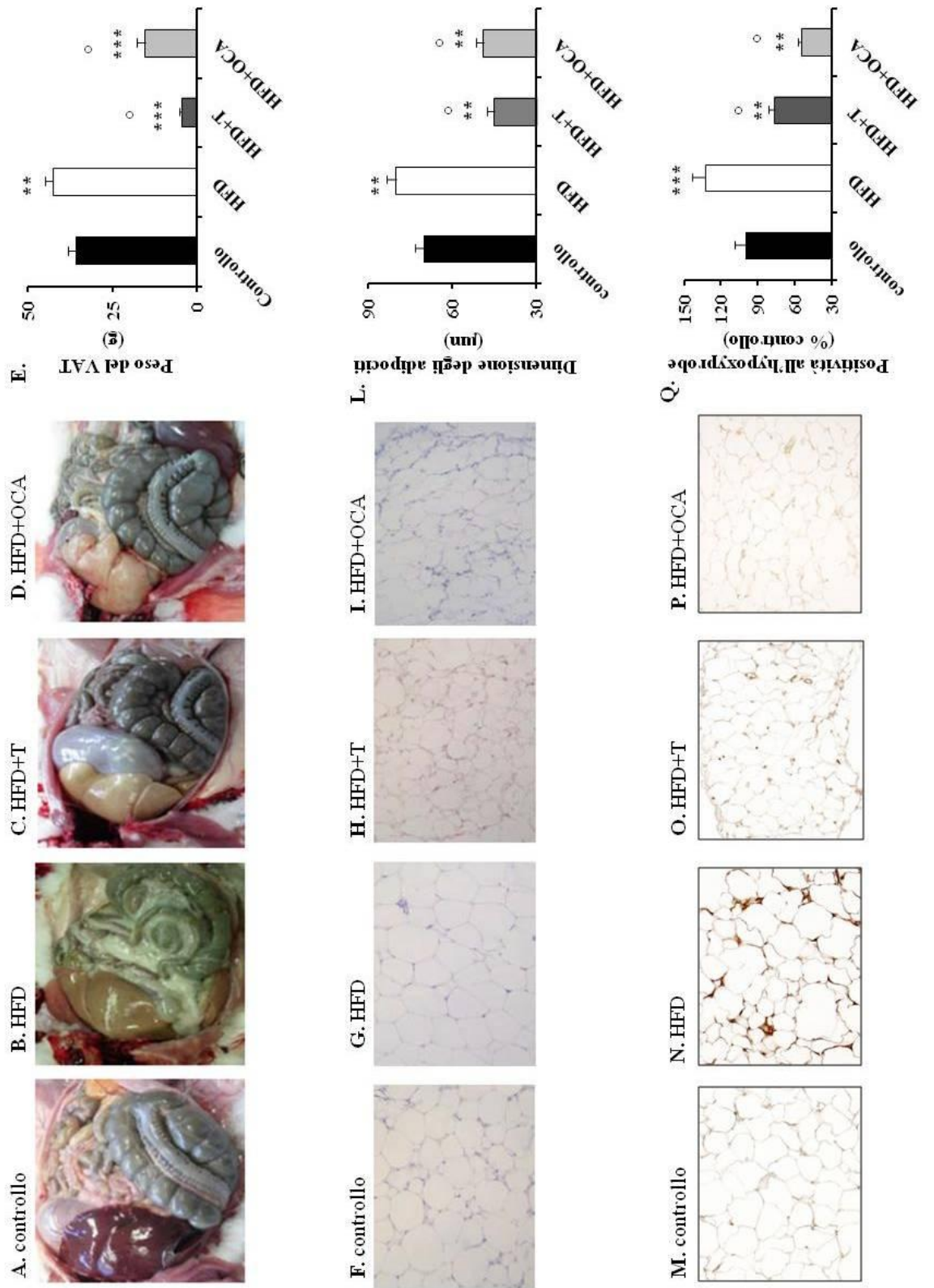
Associazione tra il numero di componenti della SM (ascissa) e iAUC glucosio (A, n=52, ordinata), ΔT (B, n=59, ordinata) e ΔE_2 (C, n=61, ordinata), ottenuto mediante un'analisi di regressione univariata di Spearman. Il coefficiente relativo di correlazione (r) e il livello di significatività (p) sono riportati nella figura.

Figura 6.



Associazione tra l'espressione dell'mRNA di GLUT4 (ordinata) e ΔT (A, ascissa) o ΔE_2 (B, ascissa), ottenuto mediante un'analisi di regressione univariata di Spearman (n=65). (C) Associazione tra l'espressione dell'mRNA dell'adiponectina (ordinata) e ΔT (ascissa), ottenuto mediante un'analisi di regressione univariata di Spearman (n=60). (D) Associazione tra l'espressione dell'mRNA di CAIX (ordinata) e ΔE_2 (ascissa), ottenuto mediante un'analisi di regressione univariata di Spearman (n = 54). Il coefficiente relativo di correlazione (r) e il livello di significatività (p) sono riportati all'interno del testo. Le linee continue indicano l'intervallo di confidenza del 95% della regressione lineare.

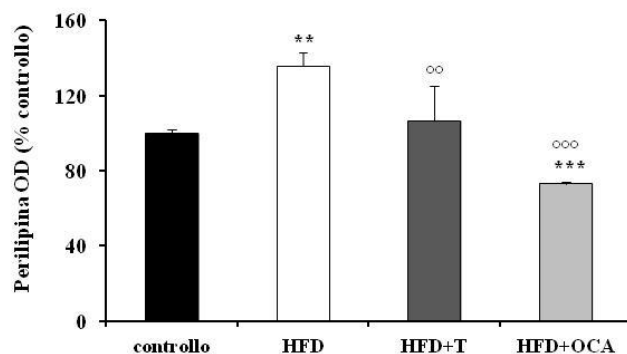
Figura 7.



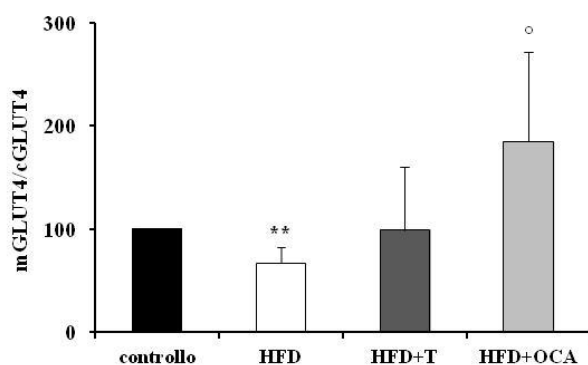
Effetti dell'HFD e dei trattamenti sul peso del VAT, sulle dimensioni degli adipociti e sull'ipossia nei vari gruppi sperimentali. (A, B, C e D) Le immagini mostrano l'accumulo di grasso viscerale all'interno delle anse intestinali. (E) Il peso del VAT era significativamente aumentato nei conigli HFD (n=36), se confrontato con i conigli di controllo (n=38), HFD+T (n=19) e HFD+OCA. (F, G, H e I) Immagini rappresentative delle sezioni di VAT, di ciascun gruppo sperimentale, colorate con ematossilina/eosina (ingrandimento 20x). (L) Analisi istomorfometrica del diametro degli adipociti (μm) nei diversi gruppi sperimentali (n=3 per ciascun gruppo). (M, N, O e P) Il grado di ossigenazione dei campioni di VAT è stato analizzato mediante uno specifico kit (Hypoxyprobe). Gli addotti proteici Hypoxyprobe-positivi sono stati rivelati nelle cellule ipossiche ($\text{PO}_2 < 10 \text{ mmHg}$) delle sezioni trasversali di VAT da parte di un MAB (ingrandimento 12,5x). Una scarsa positività all'hypoxyprobe è stata rilevata nel VAT dei conigli controllo (M), HFD+T (O) e HFD+OCA (P), mentre un'intensa positività è stata rilevata nel VAT dei conigli HFD (N). (Q) Analisi quantitativa computerizzata delle immagini di tre esperimenti indipendenti (n=3 per ogni gruppo). La densità ottica del controllo è stata presa come 100%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ vs controllo, ° $p < 0,0001$ vs HFD.

Figura 8.

A.

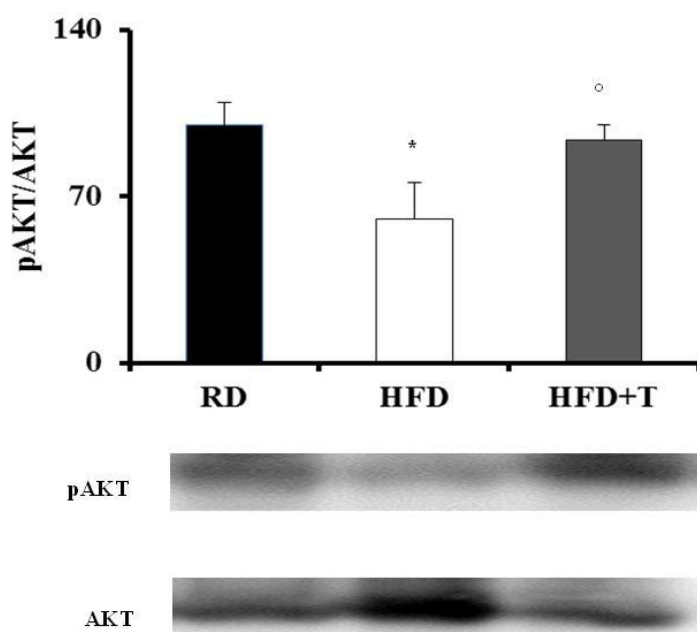


B.



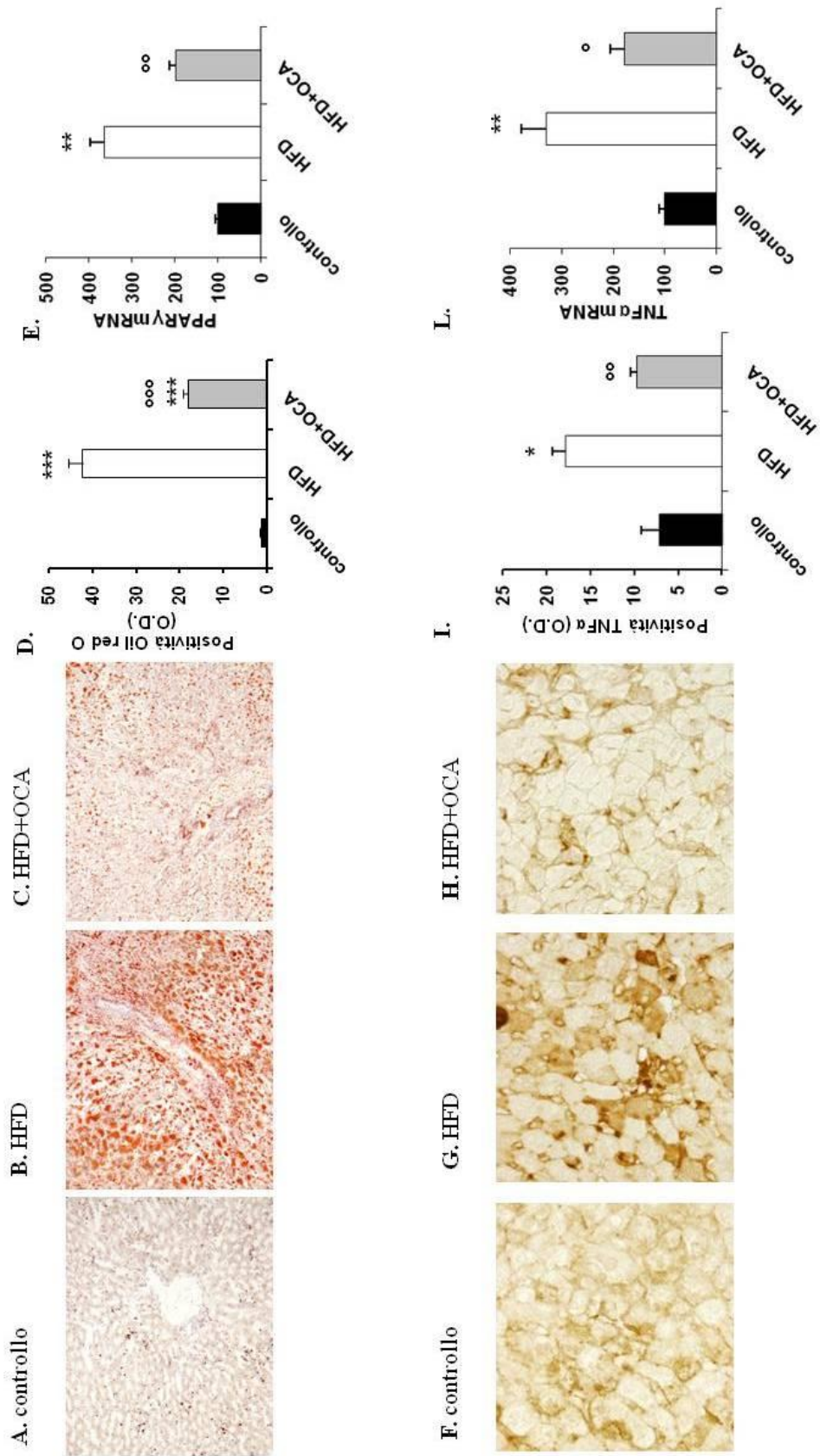
Analisi dell'espressione della proteina perilipina e della traslocazione a membrana di GLUT4 in estratti proteici di VAT dei vari gruppi sperimentali. (A) Grafico dell'analisi di densità ottica (OD) dell'intensità della banda perilipina normalizzata STAT1 (n=3 per ogni gruppo). I dati sono espressi come media±SEM. La densità ottica del controllo è stata presa come 100%. (B) Il grafico mostra l'analisi della densità ottica del rapporto membrana (m)/citosol (c) di GLUT4, espresso come media±SEM di almeno tre diversi campioni per ogni gruppo. **p<0,01; ***p<0,0001 vs controllo; °p<0,05; °°p<0,01; °°°p<0,0001 vs HFD.

Figura 9.



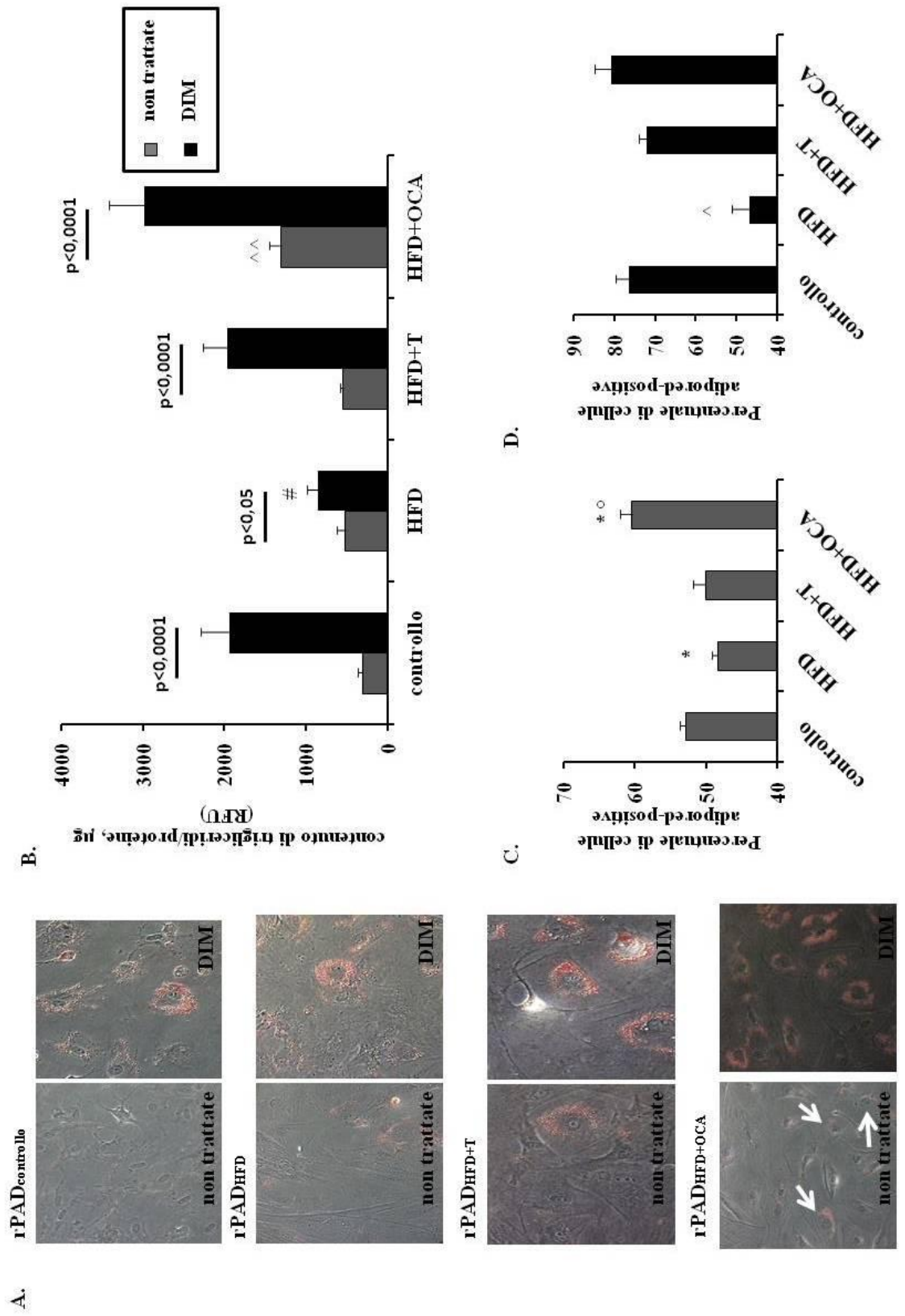
Analisi dell'espressione del rapporto pAKT/AKT in estratti proteici di VAT provenienti dai gruppi controllo, HFD e HFD+T. Il pannello inferiore mostra le immunoblot rappresentative con pAKT e AKT come anticorpi primari su estratti proteici totali di VAT dai conigli controllo, HFD e HFD+T. Il grafico mostra l'analisi della densità ottica del rapporto pAKT/AKT espresso come $\text{medi} \pm \text{SEM}$ di almeno tre diversi campioni per ogni gruppo. * $p < 0,05$ vs controllo; ° $p < 0,05$ vs HFD.

Figura 10.



Il trattamento con OCA migliora la steatosi e l'infiammazione HFD-indotta a livello epatico. (A, B e C) L'accumulo lipidico è stato osservato in sezioni di fegato dei conigli controllo, HFD, HFD+OCA mediante colorazione Oil Red O (ingrandimento 10x). Un'omogenea e abbondante infiltrazione lipidica a livello epatico è stata osservata nei conigli HFD (B) rispetto ai conigli di controllo (A). Il trattamento con OCA contrasta nettamente l'accumulo di lipidi indotto dall'HFD, che è rimasto limitato principalmente alla regione perilobulare occupata dal sistema portale (C). Analisi quantitativa computerizzata della colorazione Oil Red O (D). Espressione relativa dell'mRNA di PPAR γ , marcatore specifico di steatosi, valutata nei campioni di fegato dei conigli controllo (n=38), HFD (n=36), HFD+OCA (n=18), utilizzando la RT-PCR quantitativa. L'analisi dei risultati è stata basata sul metodo di confronto del ciclo soglia (Ct), utilizzando la subunità 18s dell'RNA ribosomiale come gene di riferimento per la normalizzazione. (F, G e H) Analisi immunohistochimica del TNF α in sezioni di fegato dei conigli controllo, HFD e HFD+OCA (ingrandimento 20x). Le sezioni di fegato dei conigli HFD mostrano un'intensa immunopositività intraepatocitaria per l'anticorpo anti-TNF α (G), rispetto ai conigli di controllo (F), notevolmente attenuata dal trattamento con OCA (H) Analisi quantitativa computerizzata della colorazione anti-TNF α (I). Espressione relativa dell'mRNA di TNF α , marcatore di infiammazione, valutata nei campioni di fegato dei conigli controllo (n=38), HFD (n=36), HFD+OCA (n=18), utilizzando la RT-PCR quantitativa. L'analisi dei risultati è stata basata sul metodo di confronto del ciclo soglia (Ct), utilizzando la subunità 18s dell'RNA ribosomiale come gene di riferimento per la normalizzazione. I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo. *p<0,01, **p<0,001 e *** p<0,0001 vs controllo; °p<0,05, °°p<0,01 e °°°p<0,0001 vs HFD.

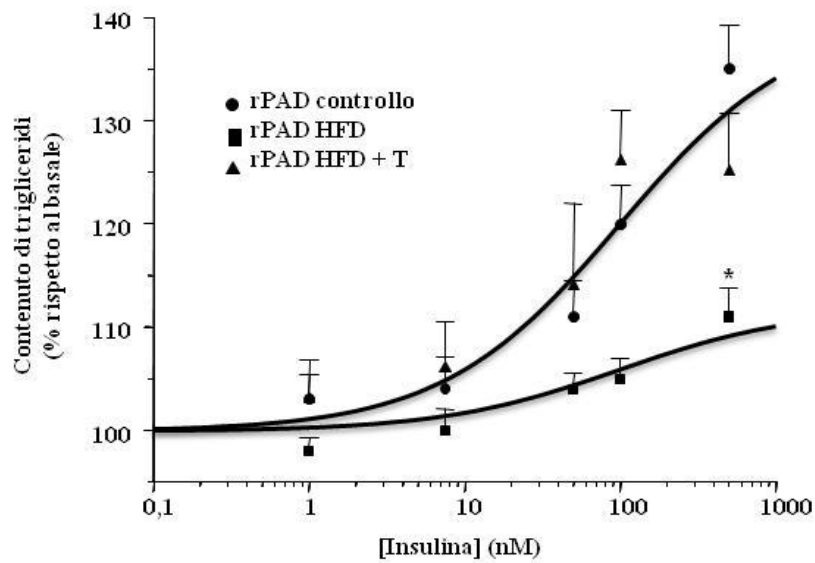
Figura 11.



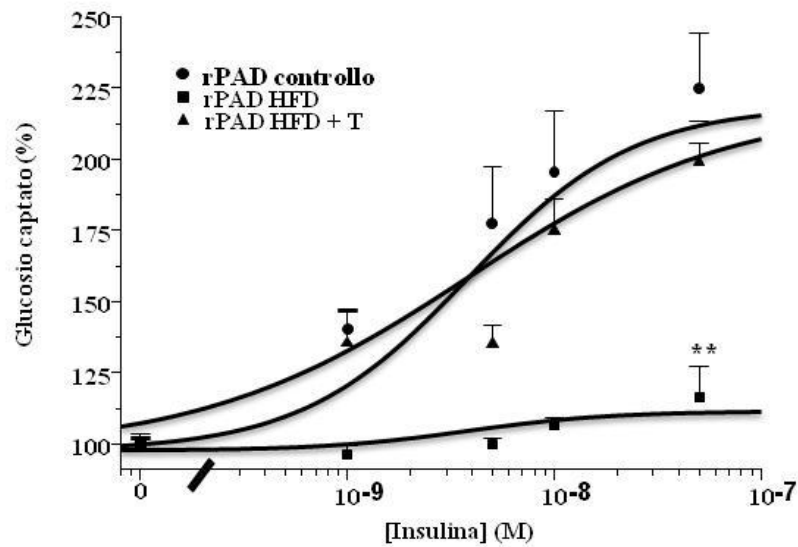
Effetto dell'HFD e dei trattamenti sulla differenziazione adipogenica. (A) Valutazione qualitativa, mediante colorazione Oil Red O, dell'accumulo di trigliceridi intracellulari nelle rPAD isolate da tutti i gruppi sperimentali, non trattate (pannelli a sinistra) o trattate con DIM per 10 giorni (pannelli a destra; ingrandimento 40x). Le rPAD_{HFD+OCA} non trattate sono più positive alla colorazione Oil Red O (freccette bianche) rispetto alle altre rPAD non trattate (B) Valutazione quantitativa, mediante Adipored Assay, del contenuto di trigliceridi nelle rPAD non trattate (barre grigie) o trattate con DIM (barre nere) isolate da tutti i gruppi sperimentali. I risultati sono espressi come unità di fluorescenza relativa (RFU) per microgrammi di proteina e sono riportati come media±SEM (n=5 per ogni gruppo). *p<0,01 vs altre rPAD DIM-trattate. (C) Analisi del contenuto di goccioline lipidiche nelle rPAD non trattate Adipored-positive isolate da tutti i gruppi sperimentali. Le cellule Adipored-positive sono state contate utilizzando il software ImageJ e i dati sono stati espressi come variazione percentuale rispetto cellule totali. (D) Analisi del contenuto di goccioline lipidiche nelle rPAD trattate con DIM, Adipored-positive, isolate da tutti i gruppi sperimentali. Le cellule Adipored-positive sono state contate utilizzando il software ImageJ e i dati sono stati espressi come variazione percentuale rispetto cellule totali. *p<0,01 vs controllo; °p<0,01 vs HFD; ^p<0,01; ^^p<0,01 vs tutti gli altri gruppi; #p<0,01 rispetto a tutte le altre rPAD DIM-indotte.

Figura 12.

A.



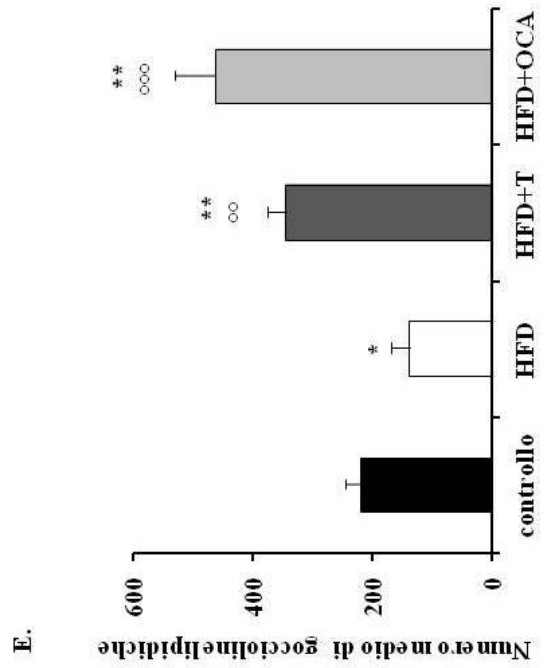
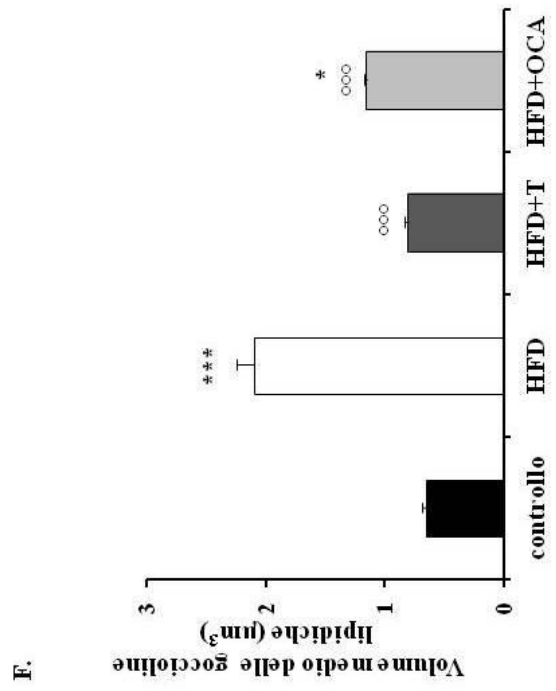
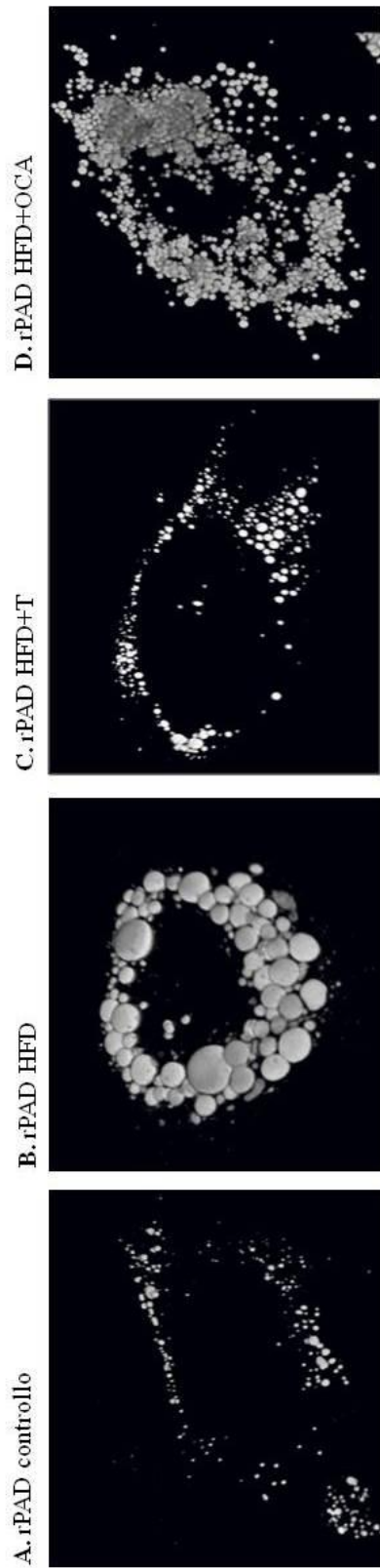
B.



La sensibilità all'insulina nelle rPAD DIM-indotte. (A) Valutazione quantitativa, mediante Adipored Assay, della capacità delle rPAD DIM-indotte di sintetizzare trigliceridi in risposta a dosi crescenti di insulina. I dati sono espressi in % rispetto allo 0 nM di insulina (basale) e riportati come media \pm SEM di 4 esperimenti diversi, ciascuno effettuato in quadruplicato. I valori

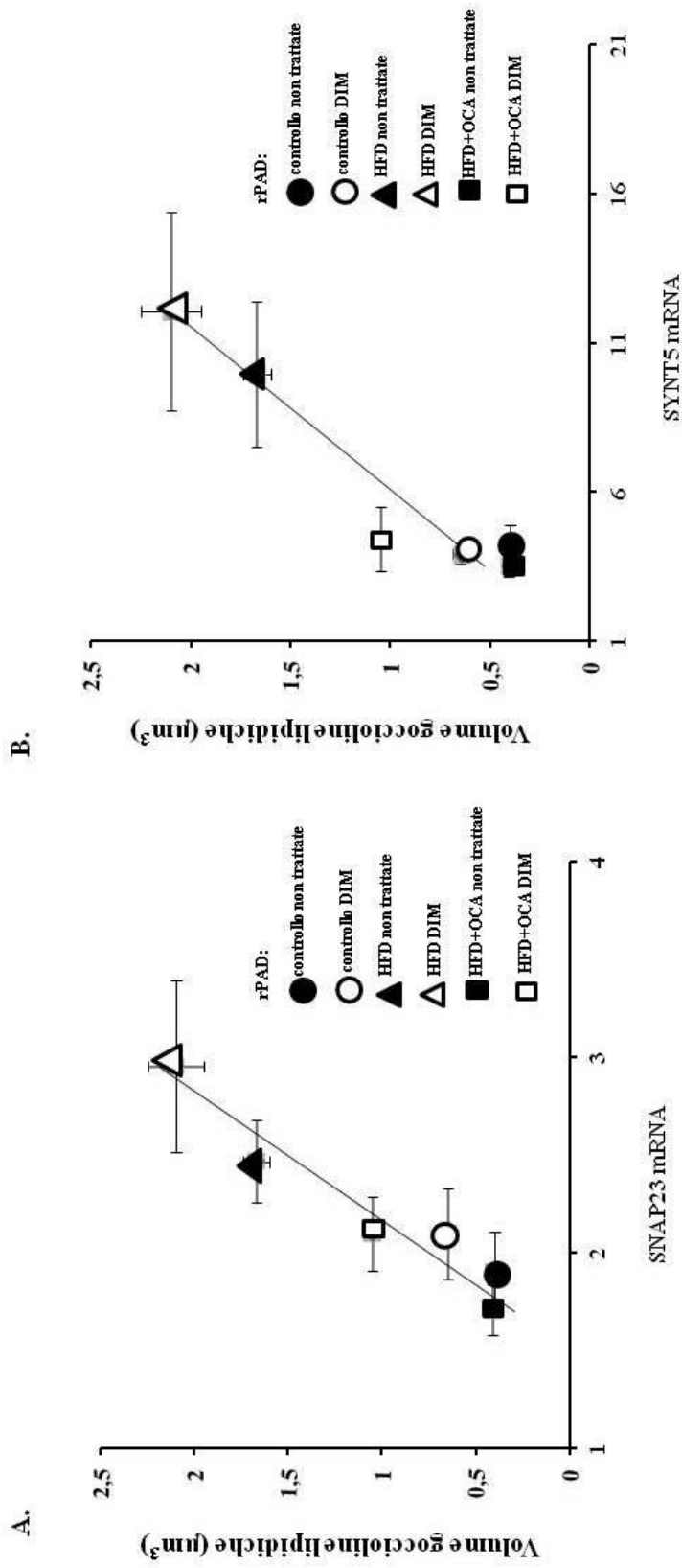
dell'EC₅₀ e dell'E_{max} relativi sono riportati nel testo. *p<0,01 vs E_{max} degli altri gruppi. (B) Valutazione quantitativa, mediante saggio radiometrico, della capacità delle rPAD DIM-indotte di captare il glucosio in risposta a dosi crescenti di insulina. I dati sono espressi in % rispetto allo 0 nM di insulina e riportati come media ± SEM di 4 esperimenti diversi, ciascuno effettuato in duplicato. I valori dell'EC₅₀ e dell'E_{max} relativi sono riportati nel testo *p<0,01; **p<0,001 vs E_{max} degli altri gruppi.

Figura 13.



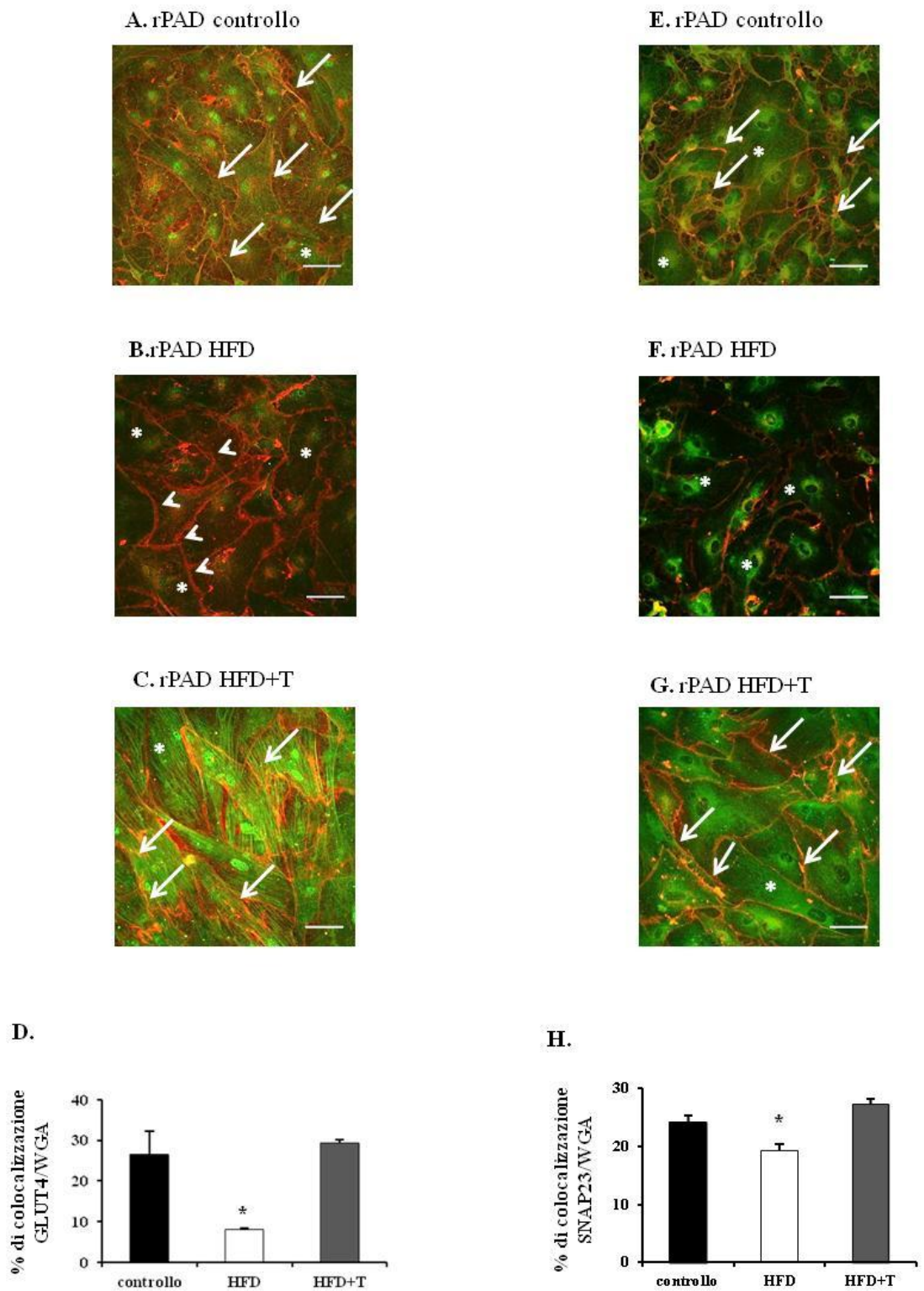
Effetto dell'HFD e dei trattamenti sul processo di fusione delle goccioline lipidiche. Le rPAD isolate dai gruppi controllo (A), HFD (B), HFD+T (C) e HFD+OCA (D) sono state fotografate mediante microscopia confocale (ingrandimento 63x) . Le immagini sono state quantitativamente analizzate utilizzando il software Volocity 5 per misurare il numero (E) e il volume (μm^3 ; F) delle goccioline lipidiche all'interno della singola cella . Almeno otto cellule sono state analizzate per ciascun gruppo . I risultati sono riportati come $\text{media} \pm \text{SEM}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ vs controllo; °° $p < 0,001$; °°° $p < 0,0001$ vs HFD.

Figura 14.



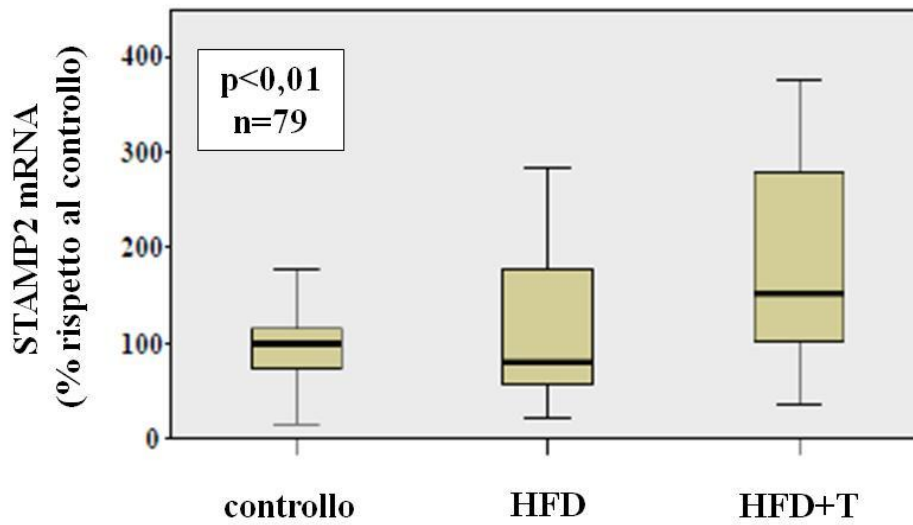
Effetto dell'HFD e dei trattamenti sul processo di fusione delle goccioline lipidiche. Relazione tra il volume delle goccioline lipidiche (espresso in μm^3 , ordinata) e l'espressione dell'mRNA di SNAP23 o SYNT5 (ascissa) nelle rPAD trattate con e senza DIM, come ottenuto mediante un'analisi di regressione univariata di Spearman.

Figura 15.



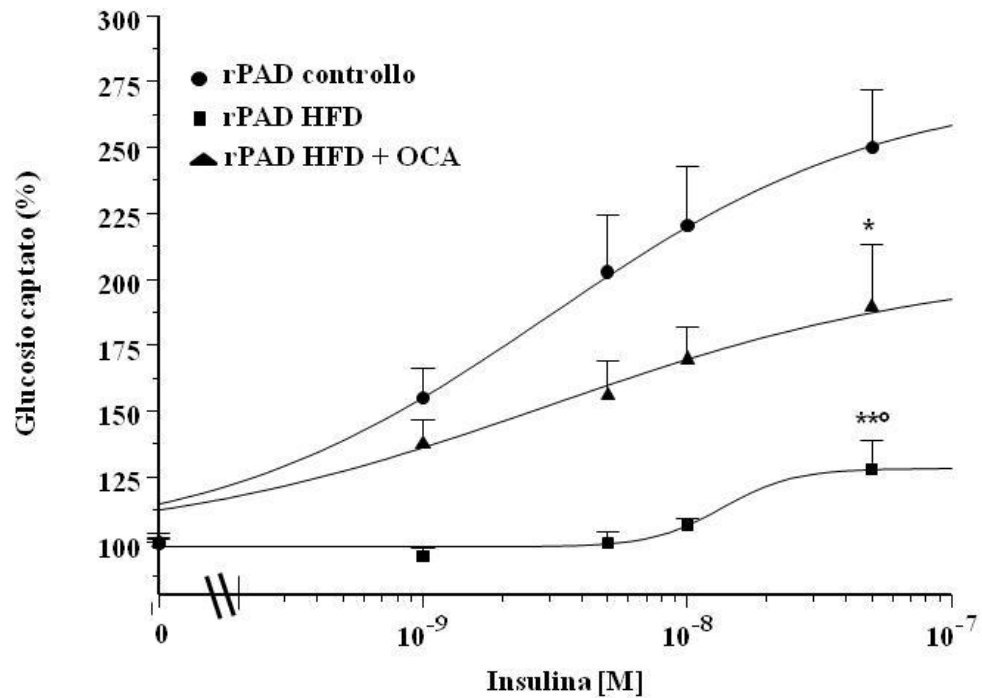
Effetto dell'insulina (100 nM, 5 min) sull'immunolocalizzazione a membrana di GLUT4 o SNAP23 nelle rPAD DIM-indotte isolate dai gruppi controllo (A, E rispettivamente), HFD (B, F rispettivamente) e HFD+T (C, G rispettivamente). L'immunolocalizzazione è stata visualizzata mediante doppia marcatura con l'anticorpo anti- WGA (marcatore di membrana; colore rosso o frecce bianche) e gli anticorpi anti- GLUT4 o anti- SNAP23 (colore verde o asterisco bianco) , mentre la colocalizzazione è stata visualizzata mediante la fusione delle immagini (colore giallo o frecce bianche). La percentuale di colocalizzazione GLUT4/WGA (D) o SNAP23/WGA (H) è stata rilevata con il microscopio confocale Leica SP2-AOBS e calcolata utilizzando il software ImageJ. I dati sono riportati come media \pm SEM (n=3). Barre=58 μ m. *p<0,01 rispetto agli altri gruppi.

Figura 16.



Analisi dell'espressione dell'mRNA di STAMP2 nel VAT. Analisi quantitativa dell'espressione dell'mRNA di STAMP2 valutata negli estratti di VAT da tutti i gruppi sperimentali, utilizzando la real-time RT-PCR quantitativa. L'analisi dei risultati è stata basata sul metodo di confronto del ciclo soglia (Ct), utilizzando la subunità 18s dell'RNA ribosomiale come gene di riferimento per la normalizzazione. I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo.

Figura 17.



La sensibilità all'insulina nelle rPAD DIM-indotte. Valutazione quantitativa, mediante saggio radiometrico, della capacità delle rPAD DIM-indotte di captare il glucosio in risposta a dosi crescenti di insulina. I dati sono espressi in % rispetto allo 0 nM di insulina e riportati come media \pm SEM di 5 esperimenti diversi, ciascuno effettuato in duplicato. I valori dell' EC_{50} e dell' E_{max} relativi sono riportati nel testo. * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ vs. controllo; ° $p < 0,01$ vs. HFD. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs controllo; ° $p < 0,01$ vs HFD+OCA.

Bibliografia

Abizaid A, Gao Q, Horvath TL. Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron*, 51(6):691-702, 2006.

Adorini L, Pruzanski M, Shapiro D. Farnesoid X receptor targeting to treat non alcoholic steatohepatitis. *Drug Discovery Today*, 17 988–997, 2012, review.

Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L, Zalin A, Labib M, Kumar S, Simpson H, Blom D, Marais D, Schwabe J, Barroso I, Trembath R, Wareham N, Nagy L, Gurnell M, O'Rahilly S, Chatterjee K. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metabolism*, 4(4):303-11, 2006.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11,327-332, 2000.

Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Molecular and cellular biology*, 25(12):4946-55, 2005.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr, International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120:1640–1645, 2009.

Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*, 52: 1210–4, 2003.

Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 92(6-7):229-36, 2013.

Allan CA, Strauss BJ, Burger HG, Forbes EA, Mclachlan R.I. Testosterone therapy prevents gain in visceral adipose tissue and loss of skeletal muscle in non-obese aging men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93: 139–46, 2008.

American college of endocrinology. ACE Position Statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine Practice*, 9: 240-52, 2003.

Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *The Journal of biological chemistry*, 276:28857–28865, 2001.

Auwerx J, Martin G, Guerre-Millo M, Staels B. Transcription, adipocyte differentiation, and obesity. *Journal of molecular medicine*, 74(7):347-52, 1996.

Azadzoï KM, Saenz DE, Tejada I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *The Journal of Urology*, 146: 238–40, 1991.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 6695,790-3, 1998.

Bai Y, Sun Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obesity Reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 16(2):127-36, 2015.

Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28, 783–789, 2004.

Bal K, Oder M, Sahin AS, Karatas C, Demir O, Can E, Gümüş BH, Ozer K, Sahin O, Esen AA. Prevalence of metabolic syndrome and its association with erectile dysfunction among urologic patients: metabolic backgrounds of erectile dysfunction. *Urology*, 69: 356–60, 2007.

Banks WA. The many lives of leptin, *Peptides*, 25, 331-338, 2004.

Bansal TC, Guay AT, Jacobson J, Woods BO, Nesto RW. Incidence of metabolic syndrome and insulin resistance in a population with organic erectile dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 2: 96–103, 2005.

Baratta M. Leptin – from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 8, RA282–RA292, 2002.

Basaria S. Androgen deprivation therapy, insulin resistance, and cardiovascular mortality: an inconvenient truth. *Journal of Andrology*, 29: 534–9, 2008.

Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ, Casaburi R. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82(2):407-13, 1997.

Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, Chen X, Yarasheski KE, Magliano L, Dzekov C, Dzekov J, Bross R, Phillips J, Sinha-Hikim I, Shen R, Storer TW. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 281(6):E1172-81, 2001.

Bishop-Bailey D, Walsh DT, Warner TD. Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:3668–3673, 2004.

Bjørnbæk C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent progress in hormone research*, 59, 305-331, 2004.

Björntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care*, 14(12):1132-43, 1991.

Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(2):163-77, 2013.

Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, Fernandez-Rodriguez J, Ericson J, Nilsson T, Borén J, Olofsson SO. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature Cell Biology*, 9 1286–1293, 2007.

Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *The New England journal of medicine*, 322(21):1477-82, 1990.

Boyanov MA, Boneva Z, Christov VG. Testosterone supplementation in men with type 2 diabetes, visceral obesity and partial androgen deficiency. *Aging Male*, 6: 1–7, 2003.

Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 48 2547–2559, 2007

Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*, 29, 109-117, 2006.

Brodsky IG, Balagopal P, Nair KS. Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men--a clinical

research center study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 81(10):3469-75, 1996.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289: 2122–5, 2000.

Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC, Pralong FP. Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology*, 144: 4484–91, 2003.

Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54(8):2277-86, 2005.

Cannon B, Hedin A, Nedergaard J: Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Letters*, 150, 129-132, 1982.

Cariou B, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Staels B. Farnesoid X receptor: a new player in glucose metabolism? *Endocrinology*, 146, 981–983, 2005a.

Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk T, Grefhorst A, Bouchaert E, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, Staels B. Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Letters*, 579, 4076–4080, 2005b.

Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, Staels B. The farnesoid x receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *The Journal of biological chemistry*, 281: 11039–11049, 2006.

Cartwright MJ, Tchkonina T, Kirkland JL. Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Experimental gerontology*, 42(6):463-71, 2007.

Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*, 48(1):132-9, 2005.

Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK & Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20 16–24, 2009.

Christodoulides C, Laudes M, Cawthorn WP, Schinner S, Soos M, O'Rahilly S, Sethi JK, Vidal-Puig A. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *Journal of cell science*, 119 (Pt 12):2613-20, 2006.

Chun KH, Araki K, Jee Y, Lee DH, Oh BC, Huang H, Park KS, Lee SW, Zabolotny JM & Kim YB. Regulation of glucose transport by ROCK1 differs from that of ROCK2 and is controlled by actin polymerization. *Endocrinology*, 153 1649–1662, 2012.

Cinti S, Zancanaro C, Sbarbati A: Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. *Biology of the Cell/under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 67,359-362, 1989.

Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids*, 73(1):9-15, 2005.

Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3):319-28, 2001.

Cipriani S, Mencarelli A, Palladino G, Fiorucci S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *Journal of Lipid Research*, 51 771–784, 2010.

Cohen SL, Halaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D, Hecht R, Collins F. Human leptin characterization. *Nature*, 3, 582:589, 1996.

Comeglio P, Morelli A, Cellai I, Vignozzi L, Sarchielli E, Filippi S, Maneschi E, Corcetto F, Corno C, Gacci M, Vannelli GB, Maggi M. Opposite effects of tamoxifen on metabolic syndrome-induced bladder and prostate alterations: a role for GPR30/GPER? *Prostate*, 74(1):10-28, 2014.

Corona G, Fagioli G, Mannucci E, Romeo A, Rossi M, Lotti F, Sforza A, Morittu S, Chiarini V, Casella G, Di Pasquale G, Bandini E, Forti G, Maggi M. Penile Doppler ultrasound in patients with ED: role of peak systolic velocity measured in the flaccid state in predicting arteriogenic ED and silent coronary artery disease. *Journal of Sexual Medicine*, 5: 2623-34, 2008c.

Corona G, Mannucci E, Fisher AD, Lotti F, Petrone L, Balercia G, Bandini E, Forti G, Maggi M. Low levels of androgens in men with erectile dysfunction and obesity. *Journal of Sexual Medicine*, 5: 2454-63, 2008a.

Corona G, Mannucci E, Lotti F, Fisher AD, Bandini E, Balercia G, Forti G, Maggi M. Pulse pressure, an index of arterial stiffness, is associated with androgen deficiency and impaired penile blood flow in men with ED. *Journal of Sexual Medicine*, 6: 284–92, 2008b.

Corona G, Mannucci E, Petrone L, Balercia G, Fisher AD, Chiarini V, Forti G, Maggi M. ANDROTEST: a structured interview for the screening of hypogonadism in patients with sexual dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 3: 706–15, 2006b.

Corona G, Mannucci E, Petrone L, Balercia G, Paggi F, Fisher AD, Lotti F, Chiarini V, Fedele D, Forti G, Maggi M. NCEP ATPIII-defined metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and prevalence of hypogonadism in male patients with sexual dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 4: 1038–45, 2007a.

Corona G, Mannucci E, Petrone L, Ricca V, Balercia G, Mansani R, Chiarini V, Giommi R, Forti G, Maggi M. Association of hypogonadism and type II

diabetes in men attending an outpatient erectile dysfunction clinic. *International Journal of Impotence Research*, 18: 190–7, 2006c.

Corona G, Mannucci E, Petrone L, Schulman C, Balercia G, Fisher AD, Chiarini V, Forti G, Maggi M. A comparison of NCEP-ATPIII and IDF metabolic syndrome definitions with relation to metabolic syndrome-associated sexual dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 4: 789–96, 2007b.

Corona G, Mannucci E, Schulman C, Petrone L, Mansani R, Cilotti A, Balercia G, Chiarini V, Forti G, Maggi M. Psychobiologic correlates of the metabolic syndrome and associated sexual dysfunction. *European Urology*, 50:595-604, 2006a.

Corona G, Monami M, Rastrelli G, Aversa A, Tishova Y, Saad F, Lenzi A, Forti G, Mannucci E, Maggi M. Testosterone and metabolic syndrome: a meta-analysis study. *Journal of Sexual Medicine*, 8 272–283, 2011a.

Corona G, Monami M, Rastrelli G, Melani C, Balzi D, Sforza A, Forti G, Mannucci E, Maggi M. Is metabolic syndrome a useless category in subjects with high cardiovascular risk? Results from a cohort study in men with erectile dysfunction *Journal of Sexual Medicine*, 8 504–511, 2011b.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, 53(5):1285-92, 2004.

Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*, 142 711–725.e6, 2012.

De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M. Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *The Journal of biological chemistry*, 278, 39124–39132, 2003.

De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Applications to bioassay, radioligand assay, and physiological

dose– response curves. *The American Journal of Physiology*, 235: E97–102, 1978.

Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology*, 145(12):5589-97, 2004.

Demir T, Demir O, Kefi A, Comlekci A, Yesil S, Esen A. Prevalence of erectile dysfunction in patients with metabolic syndrome. *International Journal of Urology*, 13: 385–8, 2006.

Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121:140–147, 2001.

Depres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature*, 444(7121):881-7, 2006.

Derby CA, Zilber S, Brambilla D, Morales KH & Mckinlay JB. Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: the Massachusetts Male Ageing Study. *Clinical Endocrinology*, 65: 125–31, 2006.

Després JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Genetic aspects of susceptibility to obesity and related dyslipidemias. *Molecular and cellular biochemistry*, 18;113(2):151-69, 1992.

Dhindsa S, Prabhakar S, Sethi M, Bandyopadhyay A, Chaudhuri A, Dandona P. Frequent occurrence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89: 5462–8, 2004.

Dieudonne MN, Pecquery R, Boumediene A, Leneuve MC, Giudicelli Y. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *The American Journal of Physiology*, 274(6 Pt 1):C1645-52, 1998.

Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology*, 141(2):649-56, 2000.

Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 295: 1288–99, 2006.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115 1343–1351, 2005.

Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Kuipers F, Staels B. The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *The Journal of biological chemistry*, 280: 29971–29979, 2005.

Esposito K, Giugliano F, Ciotola M, De Sio M, D'armiento M, Giugliano D. Obesity and sexual dysfunction, male and female. *International Journal of Impotence Research*, 20: 358–65, 2008.

Esposito K, Giugliano F, Martedì E, Feola G, Marfella R, D'armiento M, Giugliano D. High proportions of erectile dysfunction in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 28: 1201–3, 2005.

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Current opinion in cell biology*, 10(2):165-73, 1998.

Fan W, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Sato T, Kawano H, Kato S, Nawata H. Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*, 54 1000–1008, 2005.

Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, 4, 263–273, 2006.

Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Journal of Clinical Investigation*, 100: 1166–73, 1997.

Ferrannini E, Natali A, Capaldo B., Lehtovirta M, Jacob S, Yki-Jarvinen H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), *Hypertension*, 30: 1144-9, 1997.

Fibbi B, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Silvestrini E, Chavalmane A, De Vita G, Marini M, Gacci M, Manieri C, Vannelli GB, Maggi M. Estrogens Regulate humans and epididymal rabbit. Contractility through the RhoA/Rho-kinase pathway. *The Journal of Sexual Medicine*, 6: 2173-86, 2009.

Filippi S, Vignozzi L, Morelli A, Chavalmane AK, Sarchielli E, Fibbi B, Saad F, Sandner P, Ruggiano P, Vannelli GB, Mannucci E, Maggi M. Testosterone partially ameliorates metabolic profile and erectile responsiveness to PDE5 inhibitors in an animal model of male metabolic syndrome. *The journal of sexual medicine*, 6(12):3274-88, 2009.

Fiorucci S, Cipriani S, Baldelli F, Mencarelli A. Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Progress in Lipid Research*, 49 171–185, 2010.

Forman B, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, 81:687–693, 1995.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395,763-770, 1998.

Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics*, 11, 1054-1062, 1991.

- Friedman JM. Modern science versus the stigma of obesity. *Nature Medicine*, 10: 563, 2004.
- Frühbeck G. A heliocentric view of leptin. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 301-308, 2001.
- Frühbeck G. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutrition reviews*, 60, S47-S55, 2002.
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145 5439–5447, 2004, review.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of lipid Research*, 46(7):1369-79, 2005.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307(5708):426-30, 2005.
- Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10, 14564-14568, 1996.
- Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Molecular and cellular endocrinology*, 25; 254-255:133-9, 2006.
- Garcia E, Lacasa M, Agli B, Giudicelli Y, Lacasa D. Modulation of rat preadipocyte adipose conversion by androgenic status: involvement of C/EBPs transcription factors. *The Journal of Endocrinology*, 161(1):89-97, 1999.

Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79: 997–1000, 1994.

Ginsberg-Fellner F. Growth of adipose tissue in infants, children and adolescents: variations in growth disorders. *International journal of obesity*, 5(6):605-11, 1981.

Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiologica Scandinavica*, 183(1):13-30, 2005.

Grant RW, Dixit VD Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity* 2015.

Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1):19-27, 1975.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, 78: 783–809, 1998.

Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 226(11):997-1002, 2001.

Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, Ono T, Besnard P. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *The Journal of biological chemistry*, 274:29749–29754, 1999.

Guay A, Jacobson J. The relationship between testosterone levels, the metabolic syndrome (by two criteria), and insulin resistance in a population of men with organic erectile dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 4: 1046–55, 2007.

Gündüz MI, Gümüş BH, Sekuri C. Relationship between metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Asian Journal of Andrology*, 6: 355–8, 2004.

Gupta V, Bhasin S, Guo W, Singh R, Miki R, Chauhan P, Choong K, Tchkonja T, Lebrasseur NK, Flanagan JN, Hamilton JA, Viereck JC, Narula NS, Kirkland JL, Jasuja R. Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 296(1-2):32-40, 2008.

Gurr MI, Jung RT, Robinson MP, James WP. Adipose tissue cellularity in man: the relationship between fat cell size and number, the mass and distribution of body fat and the history of weight gain and loss. *International journal of obesity*, 6(5):419-36, 1982.

Gustafson B, Eliasson B, Smith U. Thiazolidinediones increase the wingless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis. *Diabetologia*, 53(3):536-40, 2010.

Gustafson B, Smith UJ. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *Biological chemistry*, 281(14):9507-16, 2006.

Haffner SM, Shaten J, Stern MP, Smith GD, Kuller L. Low levels of sex hormone-binding globulin and testosterone predict the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in men. MRFIT Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *American Journal of Epidemiology*, 143: 889–97, 1996.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lalone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-546, 1995.

Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7):1767-75, 2006.

Hirata Y, Hosaka T, Iwata T, Le CT, Jambaldorj B, Teshigawara K, Harada N, Sakaue H, Sakai T, Yoshimoto K, Nakaya Y. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405 96–101, 2011.

Hishida T, Naito K, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M. Crucial roles of D-type cyclins in the early stage of adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(2):289-94, 2008.

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV Jr, Shelton DL, Hébert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *The EMBO Journal*, 19(15):4046-55, 2000.

Horn R, Geldszus R, Potter E, Zon Zur Muhlen A, Brabant G. Radioimmunoassay for the detection of leptin in human serum. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 104,454-458, 1996.

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56 901–911, 2007.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 95(5):2409-15, 1995.

Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*, 45,1638-1643, 1996.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of biological chemistry*, 271(18):10697-703,1996.

Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5 237–252, 2007

Inadera H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *International journal of medical sciences*, 29;5(5):248-62, 2008.

Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes*, 58(7):1550-7, 2009.

Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A, Fabbri A. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 3673–80, 1999.

Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifacio V, Isidori A, Lenzi A, Fabbri A. Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. *Clinical Endocrinology*, 63: 280–93, 2005a.

Isidori AM, Giannetta E, Gianfrilli D, Greco EA, Bonifacio V, Aversa A, Isidori A, Fabbri A, Lenzi A. Effects of testosterone on sexual function in men: results of a meta-analysis. *Clinical Endocrinology*, 63: 381–94, 2005b.

Isidori AM, Strollo F, Morè M, Caprio M, Aversa A, Moretti C, Frajese G, Riondino G, Fabbri A. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85: 1954–62, 2000.

Jacobsson B, Smith U. Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells. *Journal of Lipid Research*, 13 651–656, 1972.

Jaubert AM, Pecquery R, Dieudonne MN, Giudicelli Y. Estrogen binding sites in hamster white adipose tissue: sex- and site-related variations; modulation by testosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 100(2):179-87, 1995.

Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue.

American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 293(1):G1-4, 2007.

Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. The Journal of clinical investigation, 113(9):1318-27, 2004.

Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK, Park KS. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. Cardiovascular research, 69(1):76-85, 2006.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocrine reviews, 26(3):439-51, 2005.

Kapoor D, Clarke S, Stanworth R, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes. European Journal of Endocrinology, 156: 595–602, 2007.

Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. European Journal Endocrinology, 154: 899–906, 2006.

Kapoor D, Malkin CJ, Channer KS, Jones TH. Androgens, insulin resistance and vascular disease in men. Clinical endocrinology, 63:239-250, 2005.

Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. Biochemical and biophysical research communications, 309(2):286-90, 2003.

Kaukua J, Pekkarinen T, Sane T, Mustajoki P. Sex hormones and sexual function in obese men losing weight. Obesity Research, 11: 689–94, 2003.

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin

on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 314(2):415-9, 2004.

Kennell JA, MacDougald OA. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 280(25):24004-10, 2005.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280(5):E745-51, 2001.

Kim KA, Kim JH, Wang Y, Sul HS. Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology*, 27(6):2294-308, 2007.

Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 276, 11252–11256, 2001.

Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D: The uncoupling protein UCP: a membrane mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *The International Journal of Biochemistry*, 23, 791-801, 1991.

Korkmaz CG, Korkmaz KS, Kurys P, Elbi C, Wang L, Klock TI, Hammarstrom C, Troen G, Svindland A, Hager GL, Saatcioglu F. Molecular cloning and characterization of STAMP2, an androgen-regulated six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*, 24 4934–4945, 2005.

Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of biological chemistry*, 277(29):25863-6, 2002.

Kuipers F, Claudel T, Sturm E, Staels B. The Farnesoid X Receptor (FXR) as modulator of bile acid metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 5,319–326, 2004.

Kupelian V, Page ST, Araujo AB, Travison TG, Bremner WJ, Mckinlay JB. Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in non-obese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91: 843–50, 2006.

Kupelian V, Shabsigh R, Araujo AB, O'donnell AB, Mckinlay JB. Erectile dysfunction as a predictor of the metabolic syndrome in aging men: results from the Massachusetts Male Aging Study. *Journal of Urology*, 176: 222–6, 2006.

Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clinical science (London, England : 1979)*, 109, 243–256, 2005.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 4, 371–379, 2004.

Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyysönen K, Tuomainen TP, Salonen R, Rauramaa R, Salonen JT. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population based study. *European Journal of Endocrinology*, 149: 601-8, 2003.

Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyysönen K, Tuomainen TP, Valkonen VP, Salonen R, Salonen JT. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care*, 27: 1036–41, 2004.

Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyysönen K, Tuomainen TP, Valkonen VP, Salonen JT. The metabolic syndrome and smoking in relation to hypogonadism in middle-aged men: a prospective cohort study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90: 712–9, 2005.

Lamb J, Ramaswamy S, Ford HL, Contreras B, Martinez RV, Kittrell FS, Zahnow CA, Patterson N, Golub TR, Ewen ME. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 114:323–334, 2003.

Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochemical and biophysical research communications*, 283, 982–988, 2001.

Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 46(2):R65-72, 2011.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S. Sex-specific association of the androgen to oestrogen ratio with adipocytokine levels in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Clinical Endocrinology*, 65: 506–13, 2006.

Laurencikiene J, Skurk T, Kulyte A, Heden P, Astrom G, Sjolin E, Ryden M, Hauner H, Arner P. Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 12 E2045–E2049, 2011.

Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 25(6):293-302, 2014.

Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS medicine*, 1(2):e45, 2004.

Lin HY, Yu IC, Wang RS, Chen YT, Liu NC, Altuwaijri S, Hsu CL, Ma WL, Jokinen J, Sparks JD, Yeh S, Chang C. Increased hepatic steatosis and insulin resistance in mice lacking hepatic androgen receptor. *Hepatology*, 47: 1924–35, 2008.

Lin Y, Kokontis J, Tang F, Godfrey B, Liao S, Lin A, Chen Y, Xiang J. Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26 1908–1916, 2006.

Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ. C/EBP α is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22):12532-7, 2001.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 20:781-810, 2004.

Loves S, Ruinemans-Koerts J, De Boer H. Letrozole once a week normalizes serum testosterone in obesity-related male hypogonadism. *European Journal of Endocrinology*, 158: 741–7, 2008.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, 117(1):175-84, 2007.

Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A, Chan L. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *The Journal of biological chemistry*, 277(38):34658-61, 2002.

Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 116 1102–1109, 2006.

MacDougald OA, Cornelius P, Liu R, Lane MD. Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 270, 647–654, 1995.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor,

apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and biophysical research communications*, 221(2):286-9, 1996.

Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92,6957-6960, 1995.

Maggi, M, Schulman, C, Quinton, R, Langham, S, Uhl-Hochgraeber, K. The burden of testosterone deficiency syndrome in adult men: economic and quality-of-life impact. *The Journal of Sexual Medicine*, 4:1056-1069, 2007.

Maloney PR, Parks DJ., Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA, Willson TM. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *Journal of medicinal chemistry*, 43, 2971–2974, 2000.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6):835-9, 1995.

Mannucci E, Lambertucci L, Monami M, Fedeli A, Chiasserini V, Marchionni N, Masotti G, Ungar A. Pulse pressure and mortality in hypertensive type 2 diabetic patients. A cohort study. *Diabetes / Metabolism Research and Reviews*, 22: 172–5, 2006.

Mannucci E, Monami M, Bardini G, Sposato I, Ungar A, Pepe G, Masotti G, Marchionni N, Rotella CM. Metabolic syndrome and pulse pressure. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9: 600–2, 2007.

Mannucci E, Monami M, Cresci B, Pala L, Bardini G, Petracca MG, Dicembrini I, Pasqua A, Buiatti E, Rotella CM. National Cholesterol Education Program and International Diabetes Federation definitions of metabolic syndrome in the prediction of diabetes. Results from the Firenze-Bagno A Ripoli study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10: 430–5, 2008.

Mårin P, Holmäng S, Jönsson L, Sjöström L, Kvist H, Holm G, Lindstedt G, Björntorp P. The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *International journal of obesity and related metabolic disorder: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 16(12):991-7, 1992a.

Mårin P, Krotkiewski M, Björntorp P. Androgen treatment of middle-aged, obese men: effects on metabolism, muscle and adipose tissues. *The European Journal of Medicine*, 1(6):329-36, 1992b.

Marin P, Oden B, Bjorntorp P. Assimilation and mobilization of triglycerides in subcutaneous abdominal and femoral adipose tissue in vivo in men: effects of androgens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80: 239–43, 1996.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nanodipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature medicine*, 9, 1029-1033, 1997.

Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S. Androgen receptor functions from reverse genetic models. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2-5):95-9, 2003.

Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M, Veldhuis JD, Urban RJ. Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(6):1886-92, 1998.

Mazzanti B, Aldinucci A, Biagioli T, Barilaro A, Urbani S, Dal Pozzo S, Amato MP, Siracusa G, Crescioli C, Manuelli C, Bosi A, Saccardi R, Massacesi L, Ballerini C. Differences in mesenchymal stem cell cytokine profiles between MS patients and healthy donors: implication for assessment of disease activity and treatment. *Journal of Neuroimmunology*, 199:142-50, 2008.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biology*, 3, 2002.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12):4196-200, 1997.

Monami M, Marchionni N, Masotti G, Mannucci E. IDF and ATP-III definitions of metabolic syndrome in the prediction of all-cause mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9: 350–3, 2007.

Monami M, Marchionni N, Masotti G, Mannucci E. Prognostic value of International Diabetes Federation and Adult Treatment Panel III definitions of metabolic syndrome in Type 2 diabetic patients: what makes the difference? *Journal of Endocrinological Investigation*, 30: 626–30, 2007.

Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15):5585-92, 2002.

Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocrine reviews*, 8(1):1-28, 1987.

Morales V, Santana P, Di´Az R, Tabraue C, Gallardo G, Lo´Pez Blanco F, Herna´Ndez I, Fanjul LF, Ruiz De Galarreta C.M. Intratesticular delivery of tumor necrosis factor-alpha and ceramide directly abrogates steroidogenic acute regulatory protein expression and Leydig cell steroidogenesis in adult rats. *Endocrinology*, 144: 4763–72, 2003.

Morelli A, Comeglio P, Filippi S, Sarchielli E, Cellai I, Vignozzi L, Yehiely-Cohen R, Maneschi E, Gacci M, Carini M, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M. Testosterone and farnesoid X receptor agonist INT-747 counteract high fat diet-induced bladder alterations in a rabbit model of metabolic syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 132 80–92, 2012.

Morelli A, Comeglio P, Filippi S, Sarchielli E, Vignozzi L, Maneschi E, Cellai I, Gacci M, Lenzi A, Vannelli GB, Maggi M. Mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibition in metabolic syndrome-associated prostate alterations: an experimental study in the rabbit. *Prostate*, 73(4):428-41, 2013b.

Morelli A, Corona G, Filippi S, Ambrosini S, Forti G, Vignozzi L, Maggi M. Which patients with sexual dysfunction are suitable for testosterone replacement therapy? *Journal of Endocrinological Investigation*, 30: 880–8, 2007.

Morelli A, Sarchielli E, Comeglio P, Filippi S, Vignozzi L, Marini M, Rastrelli G, Maneschi E, Cellai I, Persani L, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M. Metabolic syndrome induces inflammation and impairs gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic area of the hypothalamus in rabbits. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 25;382(1):107-19, 2013a.

Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Pe´rez-Pe´rez R, Sabater M, Ricart W, Tinahones F, Peral B & Fernàndez-Real JM. Decreased STAMP2 expression in association with visceral adipose tissue dysfunction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96 1816–1825, 2011.

Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall HU, Kipnes M, Adorini L, Sciacca CI, Clopton P, Castelloe E, Dillon P, Pruzanski M, Shapiro D. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 145(3):574-82.e1, 2013.

Muller M, Grobbee DE, Den Tonkelaar I, Lamberts SW, Van Der Schouw YT. Endogenous sex hormones and metabolic syndrome in aging men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90: 2618–23, 2005.

Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, Cohen R.A. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *The American Journal of Physiology*, 266: H2061–7, 1994.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry*, 120(4):803-12, 1996.

Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced

responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Biological chemistry*, 281(5):2654-60, 2006.

Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarathy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J, Brunt EM, Kleiner DE, Doo E; for the NASH Clinical Research Network. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, S0140-6736(14)61933-4, 2014.

Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 6: 208–15, 2004.

O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Olivas AS, Mitra P, Larison WG, Cheang EC, Varlamov O, Corless CL, Roberts CT Jr, Marks DL. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 54 1480–1490, 2011.

Oh JY, Barrett-Connor E, Wedick NM, Wingard DL, Rancho Bernardo Study. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care*, 25: 55–60, 2002.

Olefsky JM. The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *Journal of Clinical Investigation* 57 842–851, 1976.

Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 229-242, 2005.

Page ST, Kupelian V, Bremner WJ, Mckinlay JB. The androgen receptor gene CAG repeat polymorphism does not predict increased risk of heart disease: longitudinal results from the Massachusetts Male Ageing Study. *Clinical Endocrinology*, 65: 333–9, 2006.

Paick JS, Yang JH, Kim SW, Ku JH. Severity of erectile dysfunction in married impotent patients: interrelationship with anthropometry, hormones, metabolic profiles and lifestyle. *International Journal of Urology*, 14: 48–53, 2007.

Palaniappan L, Carmethon MR, Wang Y, Hanley AJ, Fortmann SP, Haffner SM, Wagenknecht L. Predictors of the incident metabolic syndrome in adults. *Diabetes Care*, 27: 788-93, 2004.

Pasquali R, Casimirri F, De Iasio R, Mesini P, Boschi S, Chierici R, Flamia R, Biscotti M, Vicennati V. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80: 654–8, 1995.

Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 304, 1154–1158, 2004.

Pellicciari R, Gioiello A, Macchiarulo A, Thomas C, Rosatelli E, Natalini B, Sardella R, Pruzanski M, Roda A, Pastorini E Schoonjans K, Auwerx J. Discovery of 6a-ethyl-23(S)-methylcholic acid (S-EMCA, INT-777) as a potent and selective agonist for the TGR5 receptor, a novel target for diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 7958–7961, 2009.

Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS letters*, 26;579(23):5163-9, 2005.

Pitteloud N, Dwyer AA, Decruz S, Lee H, Boepple PA, Crowley WF Jr, Hayes FJ. Inhibition of LH secretion by testosterone in men requires aromatization for its pituitary but not its hypothalamic effects: evidence from the tandem study of normal and gonadotrophin-releasing hormone-deficient men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93: 784–91, 2008.

Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, Hayes FJ. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell

testosterone secretion in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90: 2636–41, 2005b.

Pitteloud N, Mootha VK, Dwyer AA, Hardin M, Lee H, Eriksson KF, Tripathy D, Yialamas M, Groop L, Elahi D, Hayes FJ. Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care*, 28: 1636–42, 2005a.

Qiu W, Andersen TE, Bollerslev J, Mandrup S, Abdallah BM, Kassem M. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(11):1720-31, 2007.

Raimondi L, De Paoli P, Mannucci E, Lonardo G, Sartiani L, Banchelli G, Pirisino R, Mugelli A, Cerbai E. Restoration of cardiomyocyte functional properties by angiotensin II receptor blockade in diabetic rats. *Diabetes*. 53:1927-33, 2004.

Ramirez ME, McMurry MP, Wiebke GA, Felten KJ, Ren K, Meikle AW, Iverius PH. Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men: comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism*, 46(2):179-85, 1997.

Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Annual Review of Nutrition*, 20:535-59, 2000.

Ravussin E. Cellular sensors of feast and famine. *The Journal of clinical investigation*, 109, 1537-1540, 2002.

Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802 363–372, 2010

Richard D, Picard F. Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 1;16:1233-60, 2011

Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R, Fiorucci S. The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Molecular Pharmacology*, 70(4):1164-73, 2006.

Rizzo G, Passeri D, De Franco F, Ciaccioli G, Donadio L, Rizzo G, Orlandi S, Sadeghpour B, Wang XX, Jiang T, Levi M, Pruzanski M, Adorini L. Functional characterization of the semisynthetic bile acid derivative INT-767, a dual farnesoid X receptor and TGR5 agonist. *Molecular Pharmacology*, 78 617–630, 2010.

Rodriguez A, Muller DC, Metter EJ, Maggio M, Harman SM, Blackman MR, Andres R. Aging, androgens, and the metabolic syndrome in a longitudinal study of aging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92: 3568–72, 2007.

Rosano, GM, Sheiban, I, Massaro, R, Pagnotta, P, Marazzi, G, Vitale, C, Mercurio, G, Volterrani, M, Aversa, A, Fini, M. Low testosterone levels are associated with coronary artery disease in male patients with angina. *International journal of impotence research*, 19:176-182, 2007.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes & development*, 16, 22–26, 2002.

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7 885–896, 2006

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289(5481):950-3, 2000.

Saad F, Gooren LJ, Haider A, Yassin A. A dose-response study of testosterone on sexual dysfunction and features of the metabolic syndrome using testosterone gel and parenteral testosterone undecanoate. *Journal of Andrology*, 29: 102–5, 2008.

Salans LB, Bray GA, Cushman SW, Danforth E Jr, Glennon JA, Horton ES, Sims EA. Glucose metabolism and the response to insulin by human adipose tissue in spontaneous and experimental obesity. Effects of dietary composition and adipose cell size. *Journal of Clinical Investigation*, 53 848–856, 1974.

Salans LB, Dougherty JW. The effect of insulin upon glucose metabolism by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age, and nutritional state. *Journal of Clinical Investigation* 50 1399–1410, 1971.

Salans LB, Knittle JL, Hirsch J The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *Journal of Clinical Investigation* 47 153–165, 1968.

Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and cellular biology*, 14(2):1431-7, 1994.

Sarruf DA, Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22) 9985–9995, 2005.

Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H, Kato S. Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 167–171, 2003.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews*, 87:507–520, 2007.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45):26746-9, 1995.

Shabsigh R, Arver S, Channer KS, Eardley I, Fabbri A, Gooren L, Heufelder A, Jones H, Meryn S, Zitzmann M. The triad of erectile dysfunction, hypogonadism and the metabolic syndrome. *International Journal of Clinical Practice*, 62: 791–8, 2008.

Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281,1683-1686, 1998.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR / BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, 102: 731–44, 2000.

Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. .Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology*, 147(1):141-54, 2006

Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*, 144(11):5081-8, 2003.

Sjöström L, Smith U, Krotkiewski M, Björntorp P. Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolism*, 21(12):1143-53, 1972.

Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, deJonge L, de la Bretonne J, Volafova J, Bray GA. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism*, 50(4):425-35, 2001.

Smith U. Effect of cell size on lipid synthesis by human adipose tissue in vitro. *Journal of Lipid Research*, 12 65–70, 1971.

Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, Hannoush P, Haddad G, Dlewati A, Santanna J, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Kapoor SC, Atkinson LE, Strom BL. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(8):2670-7, 2000.

Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlin JA, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Dlewati A, Santanna J, Rosen CJ, Strom BL. Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(8):2647-53, 1999.

Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B, Hammarstedt A, Schmelz M, Yang X, Jansson PA, Smith U. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obesity Research*, 12(3):454-60, 2004.

Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christie ME, Michael LF, Burris TP. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology*, 146, 984–991, 2005.

Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia*, 51: 527–39, 2008.

Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, Horton ES, McKinlay JB. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts Male Aging Study. *Diabetes Care*, 23: 490–4, 2000.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818):307-12, 2001.

Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 255 4745–4750, 1980.

Svartberg J. Epidemiology: testosterone and the metabolic syndrome. *International Journal of Impotence Research*, 19: 124–8, 2007.

Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased

CD11b-positive monocytes in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(47):46654-60, 2003.

Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO Journal*, 16(24):7432-43, 1997.

Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*, 81:715-36, 2012.

Targher G, Byrne CD. Clinical review: nonalcoholic fatty liver disease: a novel cardiometabolic risk factor for type 2 diabetes and its complications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98 483–495, 2013.

Tartaglia LA, Dambiski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richard GJ, Campfield LA, Cark FT, Deeds J. Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R, *Cell*, 83, 1263-1271, 1995.

Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological Review*, 93(1):359-404, 2013, review.

Tchoukalova YD, Sarr MG, Jensen MD. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 287(5):R1132-40, 2004.

Third report of the national cholesterol education program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report *Circulation*, 106: 3143-421, 2002.

Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 678–693, 2008, review.

Tibblin G, Adlerberth A, Lindstedt G, Björntorp P. The pituitary-gonadal axis and health in elderly men: a study of men born in 1913. *Diabetes*, 45: 1605–9, 1996.

Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *PNAS* 104 4401–4406, 2007.

Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry*, 77:289-312, 2008.

Traish AM, Guay AT, Feeley R, Saad F. The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome & erectile dysfunction. *Journal of Andrology*, 30: 10-22, 2008.

Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition*, 100 227–235, 2008.

Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 184(4):285-93, 2005.

Unger RH. The hyperleptinemia of obesity—regulator of caloric surpluses. *Cell*, 117, 145-151, 2004.

Varlamov O, White AE, Carroll JM, Bethea CL, Reddy A, Slayden O, O'Rourke RW, Roberts CT Jr. Androgen effects on adipose tissue architecture and function in nonhuman primates. *Endocrinology* 153 3100–3110, 2012.

Vermeulen A, Kaufman JM, Deslypere JP, Thomas G. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76: 1140–6, 1993.

Vertino AM, Taylor-Jones JM, Longo KA, Bearden ED, Lane TF, McGehee RE Jr, MacDougald OA, Peterson CA. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4):2039-48, 2005.

Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition

and obesity in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 97, 2553–2561, 1996.

Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Marini M, Chavalmane A, Fibbi B, Silvestrini E, Mancina R, Carini M, Vannelli GB, Forti G, Maggi M. Cavernous neurotomy in the rat is associated with the onset of an overt condition of hypogonadism. *The Journal of Sexual Medicine*, 6: 1270–83, 2009.

Vignozzi L, Morelli A, Filippi S, Comeglio P, Chavalmane AK, Marchetta M, Toce M, Yehiely-Cohen R, Vannelli GB, Adorini L, Maggi M. Farnesoid X receptor activation improves erectile function in animal models of metabolic syndrome and diabetes. *Journal of Sexual Medicine*, 8 57–77, 2011.

Vignozzi L, Morelli A, Sarchielli E, Comeglio P, Filippi S, Cellai I, Maneschi E, Serni S, Gacci M, Carini M, Piccinni MP, Saad F, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M. Testosterone protects from metabolic syndrome-associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit. *Journal of Endocrinology* 212 71–84, 2012.

Waki H, Tontonoz P. STAMPing out Inflammation. *Cell* 129 451–452, 2007.

Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FC. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations. *European Urology*, 30: 1-9, 2008.

Wang C, Pattabiraman N, Zhou JN, Fu M, Sakamaki T, Albanese C, Li Z, Wu K, Hulit J, Neumeister P, Novikoff PM, Brownlee M, Scherer PE, Jones JD, Whitney KD, Donehower LA, Harris EL, Rohan T, Johns DC, Pestell RG. Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation *Molecular and Cellular Biology*, 23 6159–617, 2003.

Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB, Evans M.J. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology*, 147: 4025–33, 2006.

Wang XX, Jiang T, Shen Y, Adorini L, Pruzanski M, Gonzalez FJ, Scherzer P, Lewis L, Miyazaki-Anzai S, Levi M. The farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism and diet-induced renal inflammation, fibrosis, and proteinuria. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 297:1587–1596, 2009.

Wang XX, Jiang T, Shen Y, Caldas Y, Miyazaki-Anzai S, Santamaria H, Urbanek C, Solis N, Scherzer P, Lewis L, Gonzalez FJ, Adorini L, Pruzanski M, Kopp JB, Verlander JW, Levi M. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model. *Diabetes*, 59:2916–2927, 2010.

Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology*, 48:1632–1643, 2008.

Wellen KE, Fucho R, Gregor MF, Furuhashi M, Morgan C, Lindstad T, Vaillancourt E, Gorgun CZ, Saatcioglu F, Hotamisligil GS. Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell* 129 537–548, 2007.

Wilkinson M, Morash B, Ur E. The brain is a source of leptin. *Frontiers of hormone research*, 26,106-25, 2000.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd e Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452, 2003.

Wilson JD. Androgen abuse by athletes. *Endocrine reviews*, 9(2):181-99, 1988.

Wisniewski AB, Migeon CJ, Meyer-Bahlburg HF, Gearhart JP, Berkovitz GD, Brown TR, Money J. Complete androgen insensitivity syndrome: long-term

medical, surgical, and psychosexual outcome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85: 2664–9, 2000.

Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain C, Enrich B, Rumpold H, Tilg H. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *Journal of Hepatology*, 44(3):537-43, 2006.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO Consultation. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland, World Health Organization, pp. 31-3, 1999.

Wright WS, Longo KA, Dolinsky VW, Gerin I, Kang S, Bennett CN, Chiang SH, Prestwich TC, Gress C, Burant CF, Susulic VS, MacDougald OA. Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes*, 56(2):295-303, 2007.

Wu FC, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'neill TW, Bartfai G, Casanueva F, Forti G, Giwercman A, Huhtaniemi IT, Kula K, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, European Male Aging Study Group, Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93: 2737–45, 2008.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell*, 3: 151–158, 1999.

Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJ, Lam K.S. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 18073–80, 2005.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in

the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12):1821-30, 2003.

Xu H, Uysal KT, Becherer JD, Arner P, Hotamisligil GS. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes*, 51(6):1876-83, 2002.

Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 23158–23166, 2004.

Yanase T, Fan W, Kyoya K, Min L, Takayanagi R, Kato S & Nawata H. Androgens and metabolic syndrome: lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109 254–257, 2008.

Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293 1118–1128, 2007.

Ye SQ, Zhang LQ, Adyshev D, Usatyuk PV, Garcia AN, Lavoie TL, Verin AD, Natarajan V, Garcia JG. Pre-B-cell-colony-enhancing factor is critically involved in thrombin-induced lung endothelial cell barrier dysregulation. *Microvascular Research*, 70(3):142-51, 2005.

Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21):13498-503, 2002.

Yialamas MA, Dwyer AA, Hanley E, Lee H, Pitteloud N, Hayes FJ. Acute sex steroid withdrawal reduces insulin sensitivity in healthy men with idiopathic

hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92: 4254–9, 2007.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 50230–50236, 2002.

Yu IC, Lin HY, Liu NC, Wang RS, Sparks JD, Yeh S, Chang C. Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology*, 149: 2361–8, 2008.

Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes & Development*, 18, 157-169, 2004.

Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:104–110, 2003.

Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 1006–1011, 2006

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372,425–432, 1994.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7921–7925, 1995.

Zitzmann M, Gromoll J, Von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men. *Diabetologia*, 46: 31–9, 2003.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13:4279-95, 2002.

Zumoff B, Strain GW, Miller LK, Rosner W, Senie R, Seres DS, Rosenfeld RS. Plasma free and non-sex-hormone-binding- globulin-bound testosterone are decreased in obese men in proportion to their degree of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71: 929–31, 1990.

Appendice

Abstract pubblicazioni candidate

1) [J Endocrinol](#). 2012 Dec;215(3):347-62. doi: 10.1530/JOE-12-0333. Epub 2012 Oct

Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements.

[Maneschi E](#)1, [Morelli A](#), [Filippi S](#), [Cellai I](#), [Comeglio P](#), [Mazzanti B](#), [Mello T](#), [Calcaagno A](#), [Sarchielli E](#), [Vignozzi L](#), [Saad F](#), [Vettor R](#), [Vannelli GB](#), [Maggi M](#).

Abstract

We recently demonstrated that testosterone dosing ameliorated the metabolic profile and reduced visceral adipose tissue (VAT) in a high-fat diet (HFD)-induced rabbit model of metabolic syndrome (MetS). We studied the effects of HFD and in vivo testosterone dosing on VAT function and the adipogenic capacity of rabbit preadipocytes isolated from VAT of regular diet (RD), HFD, and testosterone-treated HFD rabbits. VAT was studied by immunohistochemistry, western blot, and RT-PCR. Isolated rPADs were exposed to adipocyte differentiating mixture (DIM) to evaluate adipogenic potential. Adipocyte size was significantly increased in HFD VAT compared with RD, indicating adipocyte dysfunction, which was normalized by testosterone dosing. Accordingly, perilipin, an anti-lipolytic protein, was significantly increased in HFD VAT, when compared with other groups. HFD VAT was hypoxic, while testosterone dosing normalized VAT oxygenation. In VAT, androgen receptor expression was positively associated with mRNA expression of GLUT4 (SLC2A4) (insulin-regulated glucose transporter) and STAMP2 (STEAP4) (androgen-dependent gene required for insulin signaling). In testosterone-treated HFD VAT, STAMP2 mRNA was significantly increased when compared with the other groups. Moreover, GLUT4 membrane translocation was significantly reduced in HFD VAT, compared with RD, and increased by testosterone. In DIM-exposed preadipocytes from HFD, triglyceride accumulation, adipocyte-specific genes, insulin-stimulated triglyceride synthesis, glucose uptake, and GLUT4 membrane translocation were reduced compared with preadipocytes from RD and normalized by in vivo testosterone dosing. In conclusion, testosterone dosing in a MetS animal model positively affects VAT functions. This could reflect the ability of testosterone in restoring insulin sensitivity in VAT, thus counteracting metabolic alterations.

2) [J Endocrinol](#). 2013;218(2):215-31. doi: 10.1530/JOE-13-0109. Print 2013

FXR activation normalizes insulin sensitivity in visceral preadipocytes of a rabbit model of MetS.

[Maneschi E](#)1, [Vignozzi L](#), [Morelli A](#), [Mello T](#), [Filippi S](#), [Cellai I](#), [Comeglio P](#), [Sarchielli E](#), [Calcaagno A](#), [Mazzanti B](#), [Vettor R](#), [Vannelli GB](#), [Adorini L](#), [Maggi M](#).

Abstract

Insulin resistance is the putative key underlying mechanism linking adipose tissue (AT) dysfunction with liver inflammation and steatosis in metabolic syndrome (MetS). We have recently demonstrated that the selective farnesoid X receptor (FXR) agonist obeticholic acid (OCA) ameliorates insulin resistance and the metabolic profile with a marked reduction in the amount of visceral AT (VAT) in a high-fat diet (HFD)-induced rabbit model of MetS. These effects were mediated by the activation of FXR, since treatment with the selective TGR5 agonist INT-777 was not able to ameliorate the metabolic parameters evaluated. Herein, we report the effects of in vivo OCA dosing on the liver, the VAT, and the adipogenic capacity of VAT preadipocytes (rPADs) isolated from rabbits on a HFD compared with those on a control diet. VAT and liver were studied by immunohistochemistry, Western blot analysis, and RT-PCR. rPADs were exposed to a differentiating mixture to evaluate adipogenesis. Adipocyte size, hypoxia, and the expression of perilipin and cytosolic insulin-regulated glucose transporter GLUT4 (SLC2A4) were significantly increased in VAT isolated from the HFD rabbits, and normalized by OCA. The expression of steatosis and inflammation markers was increased in the liver of the HFD rabbits and normalized by OCA. rPADs isolated from the HFD rabbits were less sensitive to insulin, as demonstrated by the decreased insulin-induced glucose uptake, triglyceride synthesis, and adipogenic capacity, as well as by the impaired fusion of lipid droplets. OCA treatment preserved all the aforementioned metabolic functions. In conclusion, OCA dosing in a MetS rabbit model ameliorates liver and VAT functions. This could reflect the ability of OCA to restore insulin sensitivity in AT unable to finalize its storage function, counteracting MetS-induced metabolic alterations and pathological AT deposition.